

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ИНСТИТУТ МОРСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ИМЕНИ А.О. КОВАЛЕВСКОГО РАН»

На правах рукописи

Ковыршина Татьяна Борисовна

ПРИМЕНЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ БЫЧКА-КРУГЛЯКА (*NEOGOBIOUS
MELANOSTOMUS* (PALLAS, 1814)) ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО
СОСТОЯНИЯ ПРИБРЕЖНЫХ ВОД ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ

03.02.10 – гидробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Руднева Ирина Ивановна

Севастополь, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Физиологические и биохимические параметры рыб как биомаркеры состояния морской среды.....	12
1.1.1 Система биотрансформации.....	12
1.1.2 Антиоксидантная система и процессы окислительной деструкции белков.....	15
1.1.3 Характеристика белкового состава сыворотки крови рыб.....	33
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1 Характеристика объекта исследований.....	47
2.2 Ихтиологические методы.....	53
2.3 Физико-химические методы исследования тканевых экстрактов.....	54
2.3.1 Определение уровня окислительной модификации сывороточных белков крови.....	54
2.3.2 Определение активности антиоксидантных ферментов.....	55
2.3.3 Определение концентрации альбумина в сыворотке крови.....	57
2.3.4 Определение белкового состава сыворотки крови методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле.....	58
2.4 Статистическая обработка результатов.....	59
2.5 Экологическая характеристика среды обитания рыб.....	59
ГЛАВА 3 СЕЗОННЫЕ, ВОЗРАСТНЫЕ И ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА ИЗ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ.....	71
3.1 Прооксидантно-антиоксидантная система крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.....	71
3.2 Возрастные особенности прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка кругляка.....	73

3.3 Половые особенности прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка.....	78
3.4 Сезонные особенности прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.....	89
ГЛАВА 4 ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА ИЗ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ.....	94
4.1 Характеристика ЭФ-спектров белков сыворотки крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.....	94
4.2 Эколого-физиологические особенности содержания и электрофоретических свойств альбумина сыворотки крови бычка-кругляка.....	97
ГЛАВА 5 ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ БЫЧКА-КРУГЛЯКА ИЗ АКВАТОРИЙ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....	105
5.1 Состояние прооксидантно-антиоксидантной системы бычка-кругляка в условиях комплексного загрязнения акваторий Черного и Азовского морей.....	105
5.2 Влияние содержания токсичных элементов в мышцах рыб на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из побережья Севастополя (Черное море).....	112
5.3 Влияние комплексного загрязнения среды обитания на электрофоретические характеристики белков сыворотки крови бычка-кругляка из акваторий Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения.....	116
ГЛАВА 6 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	153
ВЫВОДЫ.....	157
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	159
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Оценка качества водных объектов и последствий хронического антропогенного прессинга на биоту является важнейшей проблемой гидробиологии. Для решения этой проблемы, наряду с гидробиологическими методами, в настоящее время широко применяются методы комплексной экотоксикологической оценки акваторий, основанной на способности организмов реагировать на изменения физических, химических и биологических характеристик среды обитания, что проявляется на всех уровнях их биологической организации [108; 140].

Реализация экотоксикологического подхода в гидробиологии предполагает выбор ключевых компонентов в экосистеме, играющих важную роль в трофических цепях, имеющих промысловое значение или относящихся к индикаторным видам, за которыми ведутся длительные наблюдения, а изменения анализируются в заданный период времени с учетом действующих факторов [224]. В этом отношении рыбы являются наиболее оптимальными объектами, так как относятся к позвоночным и занимают вершину трофической цепи. Негативные изменения в их организме позволяют оценить степень загрязнения природных вод и кумулятивные эффекты, сформировать представление о потенциальной опасности групп веществ, поступающих в водоемы, в том числе и для здоровья человека. Именно поэтому в ряде крупных международных проектов (MOLAR, LIMPACs, AMAP, ICP-Water и др.) для оценки экологических последствий загрязнения водной среды предпочтение отдают исследованию рыб [144]. Для этих целей используют малоподвижные донные формы с хорошо изученной биологией и повсеместно распространенные в водоеме [17].

Присутствие токсикантов в среде приводит к их накоплению в тканях рыб и развитию ранних биологических эффектов, проявляющихся в первую очередь на молекулярном и клеточном уровнях. Накопление этих изменений является причиной структурно-функциональных изменений органов, тканей и систем, лежащих в основе развития патологий. Экотоксикологическая оценка

предполагает изучение комплекса подобных изменений с применением соответствующих биоиндикаторов и биомаркеров [16; 168; 302; 307], что позволяет дать комплексную диагностику статуса морских акваторий, разработать систему оценки экологического риска и мероприятия по восстановлению экосистем [158].

Среди наиболее информативных биомаркеров, позволяющих оценить физиологическое состояние рыб и качество среды их обитания, выделяют показатели антиоксидантной (АО) ферментативной системы, индукция активности которых является неспецифической формой ответа организма на действие стресс-факторов, и показатели окислительной модификации белков (ОМБ), являющихся ранними индикаторами патологического белкового метаболизма при окислительном стрессе [16; 168; 302]. При этом изменения, происходящие на молекулярном уровне, отражаются и на организменном, что проявляется в снижении размерно-массовых характеристик рыб, изменении значений физиологических индексов, характерных для особей из акваторий, испытывающих длительное антропогенное воздействие [17; 76; 295].

В настоящее время применение биомаркеров для анализа экологического состояния акваторий узаконено в международных и национальных мониторинговых программах: в Международной программе по химической безопасности ВОЗ (IPCS), SETAC, Агентством по охране окружающей среды США, Европейской Комиссией и Организацией экономического сотрудничества и развития для разработки интегральной оценки риска для человека и среды его обитания. Биомаркеры внедрены в мониторинговые программы в Северной Америке, Европе, Австралии и Новой Зеландии. Аналогичная практика была использована при оценке экологического состояния территориальных вод России в прибрежной части Черного моря, где в качестве биомониторного вида был выбран морской ерш *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) [84; 121; 156; 171]. В Азовском море подобные работы почти не проводились поэтому данный аспект представляет интерес для изучения. В этом отношении бычок-кругляк *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) является оптимальным объектом, доступным для

исследований в обоих морях, так как отвечает требованиям, предъявляемым к биомониторным видам и обладает высокими адаптивными способностями [79; 132].

В то же время биохимический статус и обмен веществ любого организма определяется генетическими особенностями вида, а также специфическими метаболическими адаптациями к конкретным условиям среды. Таким образом, исследование комплекса биомаркеров у представителей одного вида, обитающих в разных экологических условиях имеет важное значение для выявления общих механизмов адаптации и разработки системы оценки экологического состояния морской среды.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучить возможность использования биомаркеров бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) для оценки экологического состояния прибрежных акваторий Черного и Азовского морей.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. изучить белковый состав сыворотки крови бычка-кругляка из акваторий Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения;
2. оценить сезонные, возрастные и половые особенности биомаркеров крови бычка-кругляка из двух морей;
3. изучить отклики биомаркеров рыб из прибрежных акваторий Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения с учетом долговременных тенденций;
4. установить зависимость между биомаркерами крови и концентрацией токсичных элементов в мышцах бычка-кругляка из побережья г. Севастополя;
5. оценить степень влияния изучаемых факторов на исследуемые показатели и информативность биомаркеров для использования их в мониторинговых программах.

Научная новизна. Впервые проведена сравнительная экотоксикологическая оценка многолетней динамики изменений комплекса биомаркеров бычка-кругляка из прибрежных районов г. Севастополя и

Арабатского залива Азовского моря. Установлена однотипность реакций биомаркеров рыб из разных акваторий Черного и Азовского морей на действие хронического комплексного загрязнения среды обитания. Активность АО ферментов и содержание окисленных форм белков сыворотки крови возрастали, а размерно-массовые параметры бычка-кругляка из районов исследования в двух морях снижались в 2011-2012 гг. по сравнению с 2003 г.

Показано увеличение содержания продуктов ОМБ в сыворотке крови бычка-кругляка из наиболее загрязненных акваторий, тогда как отклики антиоксидантной системы (АОС) имели неоднозначный характер.

Впервые изучены возрастные и половые особенности состояния тестируемых биомаркеров в популяциях бычка-кругляка из прибрежной зоны Севастополя и юго-западной части Азовского моря, показаны сходство и различия.

Изучена динамика изменения АО активности у бычка-кругляка в разные периоды репродуктивного цикла. Активность большинства АО ферментов увеличивалась в крови самок и самцов рыб из прибрежных районов Севастополя и юго-западной части Азовского моря в преднерестовый и нерестовый периоды. Снижение активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и глутатион-S-трансферазы (ГТ) было отмечено в эритроцитах крови самцов черноморского бычка-кругляка по сравнению с самками во время нереста.

Установлено влияние сезонных изменений гидролого-гидрохимических характеристик природных вод на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из районов исследования в двух морях. Показано увеличение активности большинства АО ферментов эритроцитов крови бычка-кругляка из севастопольских акваторий весной, а в Арабатском заливе Азовского моря – летом (СОД, пероксидазы (ПЕР)). Установлено снижение активности КАТ, глутатионредуктазы (ГР) и ГТ летом и увеличение содержания окисленных форм белков в сыворотке крови рыб из севастопольских акваторий в летне-осенний период.

Изучена корреляционная зависимость между биомаркерами крови и концентрацией токсичных элементов (ТЭ) в мышцах бычка-кругляка из побережья Севастополя. Выявлены наиболее чувствительные к содержанию ТЭ в мышцах рыб ферменты.

Доказана эффективность применения представленного в работе комплекса биомаркеров бычка-кругляка для оценки состояния рыб и среды их обитания.

Методология и методы исследования. Использован комплекс спектрофотометрических и титрометрических методов определения активности АО ферментов – КАТ, СОД, ПЕР, ГР, ГТ, уровня окислительной модификации белков и концентрации альбумина. Электрофоретический метод определения белкового состава сыворотки крови, ихтиологические методы определения размерно-массовых и морфофизиологических характеристик рыб, статистический и корреляционный анализ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Снижение активности антиоксидантных (АО) ферментов эритроцитов сопровождается увеличением содержания окисленных форм белков сыворотки крови бычка-кругляка из более загрязненных акваторий.
2. Долговременное загрязнение районов исследования в Черном и Азовском морях приводит к снижению размерно-массовых и морфофизиологических характеристик бычка-кругляка, а также увеличению активности АО ферментов эритроцитов и уровня окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови рыб.
3. Активность АО ферментов эритроцитов и уровень ОМБ сыворотки крови коррелирует с содержанием токсичных элементов в мышцах бычка-кругляка.

Теоретическая и практическая значимость работы. Комплекс биомаркеров, анализируемых в диссертационной работе, дает возможность получить адекватную информацию о состоянии популяций бычка-кругляка из Черного (в районе Севастополя) и Азовского (Арабатский залив) морей, характеризующихся разными экологическими условиями и уровнем загрязнения.

Полученные результаты имеют важное теоретическое и практическое значение для понимания гидробиологических закономерностей и процессов, происходящих в прибрежных ихтиоценозах в условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод, а также создания научно обоснованной системы анализа качества морской среды, адаптированной для побережья Крыма.

Разработана система оценки экологического состояния морской среды на основе биомаркеров бычка-кругляка, что важно для развития мониторинговых программ и проведения природоохранных мероприятий. Предложен новый биомаркер – уровень окислительной модификации белков, позволяющий оценить состояние рыб и качество среды их обитания (патент № 27484 UA, 2007).

Результаты и методические разработки данной работы использованы в ходе выполнения гранта РФФИ № 14 – 44 – 01044 «Поиск критериев оценки состояния морских прибрежных экосистем севастопольского региона на основе биомаркеров рыб» и включены в программу и содержание дисциплин «Гидробиология» и «Экотоксикология» для аспирантов ИМБИ РАН.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является обобщением результатов исследований автора, проведенных в 2003-2005 гг. и 2009-2012 гг. Тема, цель, задачи, объект, методы и программа исследования определены автором совместно с научным руководителем. Все биохимические анализы, а также статистическая обработка данных проводилась автором лично. Анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и основных защищаемых положений выполнены автором самостоятельно, при направляющем участии научного руководителя.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской конференции с участием специалистов из стран Ближнего и Дальнего зарубежья «Современные проблемы водной токсикологии» (Борок, 2004, 2005), на научной конференции «Заповедники Крыма» (Симферополь, 2005, 2007), на конференции молодых ученых «Понт Эвксинский» III и IV (Севастополь, 2003, 2005), на ежегодной Всероссийской конференции «Актуальные проблемы экологии природопользования» (Москва,

2006), на Международной научной конференции «Современные проблемы морской инженерной экологии» (Ростов-на-Дону, 2008), на II Міжнародній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2009), на Международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2010), на конференции «Современные проблемы водной токсикологии» (Петрозаводск, 2011), на международной научной конференции «Водные биоресурсы и аквакультура: современное состояние и перспективы научного обеспечения» (Киев, 2010), на Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природних наук» (Запорожье, 2011), на III Международной конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб» (Борок, 2011), на международной научно-практической конференции «Трансмиссивные болезни животных: актуальные аспекты биобезопасности и контроля» (Алушта, 2012), на Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012), на международной научной конференции «Современные вопросы экологического мониторинга водных и наземных экосистем» (Ростов-на-Дону, 2015), на IV Международной конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок, 2015).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав результатов исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 310 источников. Работа изложена на 193 страницах, содержит 39 таблиц и 20 рисунков.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 41 научная работа, из них 5 в специальных научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 7 – ВАК Украины (опубликованных до 2014 г.); получен 1 патент на изобретение.

Благодарности. Автор выражает особую благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Рудневой И.И. за помощь и консультации при постановке цели и задач исследований, обсуждении полученных результатов.

Благодарность выражается член-корр., д.б.н., проф. Шульману Г.Е., д.б.н., проф., акад. Егорову В.Н., д.б.н. Празукину А.В., д.б.н., проф. Солдатову А.А., д.б.н., проф. Зуеву Г.В. и с.н.с., к.б.н. Болтачеву А.Р. за ценные советы и рекомендации по решению поставленных задач и обсуждению основных положений работы, а также к.б.н., доценту кафедры биохимии КФУ Залевской И.Н. за консультации по методическим аспектам определения биохимических параметров.

Автор считает своим приятным долгом выразить признательность к.б.н. Салеховой Л.П., к.б.н. Скуратовской Е.Н., к.б.н. Кузьминовой Н.С., вед. инж. Чесноковой И.И., вед. инж. Самотой Ю.В. за консультации и помощь в проведении биологического анализа рыб, сотрудникам санитарно-бактериологической лаборатории Ленинского района Республики Крым и отдела «Марикультуры и морской фармакологии» ФГБУН ИМБИ к.б.н. Ковригиной Н.П. за предоставление данных по гидрохимии воды в юго-западной части Азовского моря. Благодарность выражается руководству ГАО «Черноморнефтегаз» и сотрудникам лаборатории «Охраны морских экосистем» ЮгНИРО (г. Керчь) за предоставление результатов по химическому загрязнению воды, грунтов и температурному режиму в юго-западной части Азовского моря в период исследований, заведующему отделу «Связи и передачи информации» ФГБУН ИМБИ Шайде В.Г. за помощь в техническом обеспечении научных исследований, Вахтину Б.Е. и всем работникам малого флота ФГБУН ИМБИ за доставку ихтиологического материала из районов исследования.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Физиологические и биохимические параметры рыб как биомаркеры состояния морской среды

1.1.1 Система биотрансформации

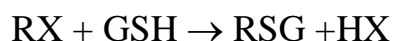
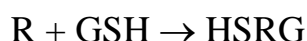
Энергетическое жизнеобеспечение клеток аэробных организмов связано с окислительными реакциями, протекающими с использованием O_2 как основного окислителя или акцептора электронов. Во всех реакциях с участием металлопротеинов и молекулярного кислорода происходит образование активных форм кислорода (АФК), обладающих высокой окислительной способностью. АФК включают синглетные соединения нерадикальной природы: синглетный кислород и перекись водорода, а также супероксидный ($O_2^{\cdot-}$), пергидроксильный (HO_2^{\cdot}), гидроксильный (OH^{\cdot}), перекисный (ROO^{\cdot}) и алкоксильный (RO^{\cdot}) радикалы. АФК различаются по времени их жизни и окислительной активности. Наиболее короткоживущими ($t_{1/2} = 7 \cdot 10^{-10}$ с) и, соответственно, реакционноспособными являются *гидроксильные радикалы*, оказывающие свое окислительное действие только в месте их образования. *Супероксидный анион-радикал* ($O_2^{\cdot-}$) и *перекись водорода* (H_2O_2) относятся к наиболее стабильным соединениям и могут диффундировать из места их генерации через клеточные и внутриклеточные мембраны путем простой диффузии, либо по анионным каналам. $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 взаимодействуют с лигандированными на макромолекулах ионами переходных металлов или переходными металлами активных центров ферментов с образованием гидроксильного радикала (OH^{\cdot}), модифицирующего липиды, белки и нуклеиновые кислоты [25; 35; 38; 272].

Известно, что одним из мощных генераторов АФК у животных является система микросомальных монооксигеназ гепатоцитов печени (МОГ), играющая важную роль в специфической защите организма и реагирующая на появление в среде ароматических хлор- и фосфорсодержащих углеводородов (нефть,

пестициды, ПХБ). В организме гидробионтов ксенобиотики подвергаются первому этапу детоксикации – **биотрансформации**, осуществляемой МОГ посредством окисления, восстановления и гидролиза. В результате ксенобиотики из исходных неполярных соединений превращаются в полярные, водорастворимые, способные перейти из гидрофобной части клеточной мембраны в водную часть клетки [241]. В реакциях детоксикации I фазы задействован большой спектр ферментов, однако в мониторинговых исследованиях наиболее часто используют CYP1A – содержащие оксигеназы, так как именно они играют ключевую роль в биотрансформации ПХДД, ПХДФ, ПХБ, ПАУ и структурно сходных соединений [157; 211; 302]. Попадая в организм рыб, эти ксенобиотики вызывают индукцию цитохрома Р-450 (CYP1A), которая проявляется в повышении активности этоксирезорифин О-деэтилазы (EROD) [211; 283].

Вторым этапом детоксикации является **конъюгация**, представляющая процессы образования полимерных соединений, в результате которых из ксенобиотиков или их метаболитов и эндогенных агентов (глюкуроновая кислота, ацетилсульфат, глицин и др.) образуются сложные вещества, которые выводятся из организма [223]. Процесс конъюгации катализирует семейство *глутатион-S-трансфераз* (ГТ) (КФ 2.5.1.18) – ферментов II фазы биотрансформации ксенобиотиков. Они близки по природе и отличаются в основном лишь субстратной специфичностью. Принцип катализируемой ими реакции заключается в присоединении восстановленного глутатиона к активированным липофильным соединениям, что облегчает их растворение и экскрецию. Благодаря участию в связывании и инактивации широкого ряда электрофильных ксенобиотиков (полиароматические углеводороды, ПХБ, тяжелые металлы, эстрогеноподобные соединения и др.) эти ферменты широко применяются как биомаркеры загрязнения окружающей среды различного рода органическими загрязнителями [51; 165; 195], а также как показатели окислительного стресса в живых организмах [123]. Данные свойства фермента позволяют отнести его как к неспецифической защитной системе организма (антиоксидантной), реагирующей

на любые воздействия, так и к специфической детоксикационной системе, реагирующей на определенные вещества в среде [170; 223]:



В то же время уровень активности ГТ в разных тканях флуктуирует и может изменяться не только при непосредственном поступлении в организм субстратов для ферментативной реакции. Существенное влияние на активность ГТ оказывают различные факторы внешней среды и физиологическое состояние рыб [118; 215; 245; 259; 281]. Так, активность этого фермента в печени плотвы значительно выше по сравнению с показателями в гонадах, жабрах, селезенке и мышцах рыб [78]. Сравнительный анализ активности ГТ в печени и эритроцитах крови хрящевых и костистых видов черноморских рыб также показал превалирование значений активности этого показателя в печени представителей обоих классов [281]. Таким образом, уровень ГТ в печени рыб имеет большие значения, что связано с высокой метаболической активностью этого органа, выполняющего ключевую роль в процессах детоксикации и, по мнению ряда авторов, обладающего специализированным изферментным набором [181]. В то же время максимальные значения ГТ были выявлены в гонадах смарида и ерша, далее в порядке убывания шли печень, селезенка и кровь [122]. Исследования на двух хрящевых и 5 костистых видах рыб показали, что активность ГТ значительно выше в крови и печени костистых рыб [281].

Наличие ксенобиотиков в среде запускает сложный механизм их детоксикации, в результате которого происходит образование АФК, способных повреждать биологические молекулы [294]. В свою очередь, усиление прооксидантных реакций приводит к воспалительным процессам в организме, реперфузионному поражению тканей, преждевременному старению, канцерогенезу и другим патофизиологическим состояниям [26]. Таким образом,

функционирование и развитие клеток в среде с АФК было бы невозможно без существования защитной АОС организма, направленной на инактивацию свободных радикалов и токсичных продуктов их метаболизма.

1.1.2 Антиоксидантная система и процессы окислительной деструкции белков

АО система живых организмов представлена низкомолекулярными антиоксидантами (НАО) и антиоксидантными ферментами (АОФ) [22; 75].

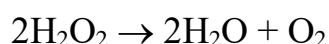
Низкомолекулярные антиоксиданты включают три группы соединений:

- содержащие енольные группы (токоферол и аскорбиновая кислота);
- SH-содержащие (аминокислоты цистеин, цистин, метионин и глутатион (GSH));
- хелатные (ферритин, трансферрин, лактоферрин, церулоплазмин, мочевая кислота и некоторые пептиды).

Система антиоксидантных ферментов специализируется на внутриклеточной защите от АФК. АО ферменты характеризуются специфичностью клеточной и органной локализации, а также использованием в качестве катализатора металлов, таких как Cu, Zn, Mn, Fe, Se [102; 303; 305].

АО ферментативная система у рыб хорошо изучена. Ключевыми ферментами являются каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза и глутатионзависимые ферменты, активность которых существенно зависит от эколого-физиологических особенностей и филогенетического положения вида [102; 253; 280].

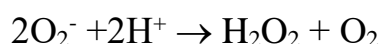
Каталаза (КАТ) (КФ 1.11.1.6) – гемосодержащий фермент с молекулярной массой ≈ 250 тыс. дальтон, локализованный преимущественно в пероксисомах клеток, где его концентрация достигает 10^{-6} М [75]. Каталаза разлагает перекись водорода до воды и кислорода [21; 303]:



Максимальное содержание этого фермента обнаружено в эритроцитах крови (300-1000 пмоль г⁻¹ Hb) и печени (100-250 пмоль г⁻¹ сырой ткани). Концентрация КАТ в сердце, селезенке и почках мала - 30-40 пмоль г⁻¹ сырой ткани, что было показано на шести видах костистых рыб (*Trichiurus lepturus*, *Sarda sarda*, *Mugil platanus*, *Astroscopus sexspinosus*, *Stephanolepis hispidus* и *Ogcocephalus vespertilio*) [217]. Активность КАТ в печени карпа (*Cyprinus carpio*) значительно выше, чем в мышцах, почках и мозге исследованных рыб [235]. Аналогичные результаты были получены не только на рыбах. Активность КАТ в гепатоцитах печени *Thamnophis sirtalis parietalis* была в 3 раза выше по сравнению с таковой в скелетных мышцах этого вида змей [232].

Установлена зависимость между активностью КАТ и экологическими особенностями вида (пищевой рацион, плавательная активность) [307]. Как известно, филогенетически более древние виды рыб характеризуются меньшей АО активностью или даже отсутствием отдельных АО ферментов [217; 218; 253]. Так, в крови некоторых примитивных видов хрящевых рыб каталаза не обнаружена [280].

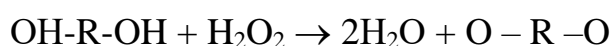
Супероксиддисмутаза (СОД) (1.15.1.1) имеет несколько изоферментных форм, различающихся строением активного центра. Для эукариот характерна Cu-Zn-СОД форма, локализованная в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий. У прокариот идентифицирована Mn-Fe-СОД. Этот фермент осуществляет реакцию дисмутации супероксидного анион радикала (O₂⁻) [21; 230]:



Концентрация СОД в крови, печени и гонадах уже упомянутых 6 видов рыб (3-37 нмоль г⁻¹ Hb) была выше по сравнению с ее содержанием в других тканях (2-8 нмоль г⁻¹ сырой ткани) [217]. Активность СОД в печени карпа выше, чем в мозге, почках и скелетных мышцах [235]. Сравнительный анализ активности СОД в гонадах, жабрах, селезенке, печени и мышцах леща (*Abramius brama*, L.) и

плотвы (*Rutilus rutilus*, L.) из Рыбинского водохранилища позволил установить ряд особенностей. Максимальные значения активности этого фермента обнаружены в гонадах, что объясняется высоким содержанием липидов в этом органе и, соответственно, уровнем ПОЛ. В дальнейшем активность СОД в порядке убывания в тканях рыб можно расположить следующим образом: печень → селезенка → жабры → мышцы [78]. В то же время содержание АО ферментов в крови, печени, сердце и красных мышцах коррелирует с метаболической и плавательной активностью рыб. Активность СОД в этих органах выше у более подвижных видов костистых рыб по сравнению с менее подвижными [218], что связано с большей затратой кислорода у активных пловцов и возможным автоокислением гемопротейна (HbO_2) с образованием свободных радикалов. Подобная динамика отмечена на хрящевых рыбах с разной плавательной активностью. Так, содержание СОД и каталазы в печени акулы было выше, чем у малоподвижного ската [217].

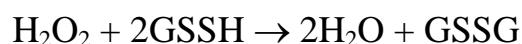
Пероксидаза (ПЕР) (КФ 1.11.1.7) также, как и каталаза, является Fe-содержащим ферментом и катализирует реакцию утилизации гидроперекисей жирных кислот и перекиси водорода [102]:



У морского ерша, морского налима (*Gaidropsarus mediterraneus*, L.), султанки (*Mullus barbatus ponticus*, Essipov), спикары (*Spicara flexuosa*, Rafinesque) и ставриды (*Trachurus mediterraneus ponticus*, Aleev) активность ПЕР была выше в крови и селезенке по сравнению с печенью и гонадами [122]. Установлено, что активность пероксидазы в печени придонных и придонно-пелагических видов рыб ниже, чем в мышцах, тогда как для подвижных видов зависимость обратная [102; 105].

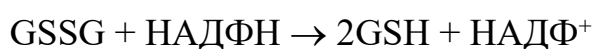
глутатион — глутатионпероксидаза — окисленный глутатион — глутатионредуктаза — восстановленный глутатион.

Важнейшим ферментом глутатионовой системы является Se-содержащая *глутатионпероксидаза* (ГП) (КФ 1.11.1.9), инактивирующая перекиси:



Этот фермент выполняет функции, сходные с функцией каталазы, но в отличие от последней, глутатионпероксидаза имеет в 3 раза большее сродство к H_2O_2 , восстанавливает гидроперекиси и локализуется в цитозоле и митохондриях. Благодаря этому глутатионпероксидаза эффективна при низких концентрациях субстрата, тогда как при высоких концентрациях H_2O_2 ключевая роль в защите клеток от окислительного стресса принадлежит каталазе [177]. Концентрация глутатионпероксидазы в зависимости от ткани варьирует в пределах 1-30 пмоль г⁻¹ сырой ткани, за исключением крови, уровень фермента в которой высок [218]. В то же время в эритроцитах крови некоторых видов рыб каталаза и глутатионпероксидаза либо не обнаружены, либо присутствовали в относительно низких концентрациях [289].

При действии на организм химических веществ, вступающих в глутатионовую конъюгацию, содержание глутатиона в тканях уменьшается, что приводит к нарушению процессов детоксикации. Уровень восстановленного глутатиона в организме зависит от интенсивности его синтеза и распада, а также от систем, которые регулируют соотношение его окисленной и восстановленной форм [310]. Обратное восстановление окисленного глутатиона (GSSG) происходит в реакции, катализируемой *глутатионредуктазой* (ГР) (КФ 2.5.18) [49; 236]:



Максимальная активность ГР была выявлена в почках, печени и мозге карпа, минимальная – в мышцах [235]. Активность ГР в тканях морского налима в

порядке убывания можно расположить следующим образом: селезенка → печень → гонады [55]. У пелагических и придонно-пелагических видов активность ГР выше в печени, у бычков эти показатели одинаковы, у придонных видов активность фермента выше в мышцах [104].

Как было отмечено ранее, смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме в сторону процессов свободнорадикального окисления (СРО) приводит к окислительной модификации макромолекул, повреждению клеточных структур и, как следствие, к различным патофизиологическим состояниям организма. В настоящее время накоплено большое количество данных, касающихся механизмов перекисного окисления липидов, его роли в нормальном функционировании клеток и при действии на организм различных факторов, в том числе антропогенных [302]. Однако АФК способны активировать не только процессы перекисного окисления липидов, но и вызывать окислительную деструкцию углеводов, нуклеиновых кислот и белков. Окислительная модификация последних приводит к изменению конформации белковых молекул и, как следствие, к изменениям их свойств и функций [38; 291; 292; 304].

Окислительная модификация белков происходит в присутствии кислорода, ионов переходных металлов, доноров электронов и комплексообразователей, способных связывать ионы металлов. Донорами электронов являются соединения, обладающие восстанавливающими свойствами (аскорбат, дитиотреитол), негемовые железосодержащие белки [293]. Источниками связанного железа и меди в клетке могут являться различные биологические макромолекулы, в том числе альбумин, ЦП, ДНК и др. [227]. Инактивация ферментов сопровождается окислительной модификацией определенных аминокислотных остатков белков (цистеин, гистидин, триптофан, метионин, тирозин) [86]. Высокая специфичность модификации обеспечивается наличием определенного места связывания ионов металлов в молекулах белков, в результате чего образующиеся в реакции Фентона гидроксильные радикалы

реагируют с близлежащими аминокислотными остатками [227]. Подобные изменения приводят к нарушению пространственной конфигурации белков, изменению молекулярной массы в результате агрегации или фрагментации, их инактивации и последующей деградации протеолитическими ферментами [10; 69; 100; 292].

Окислительная модификация белковых молекул АФК является нормальным физиологическим процессом регуляции белкового обмена и увеличивается с возрастом. Однако, в результате усиления процессов свободнорадикального окисления, вызванного различными факторами, происходит возрастание уровня окислительной модификации белковых молекул. Этот процесс опасен не только непосредственной инактивацией биомолекул, но и накоплением среднемолекулярных продуктов протеолиза – *олигопептидов* или *молекул средней массы* (МСМ). По своему строению МСМ близки к регуляторным пептидам и способны соединяться и блокировать рецепторы любой клетки, неадекватно влияя на ее метаболизм и функции [45].

Таким образом, изучение активности компонентов АОС позволяет оценить адаптивные возможности организма, связанные с физиологическими и экологическими особенностями вида, сформировавшимися в процессе эволюции [102], а также состояние его здоровья и качество среды обитания [17; 104; 165; 302]. В связи с этим особое значение приобретает исследование активности АО ферментов в комплексе с окислительной модификацией белковых молекул, как раннего биохимического маркера тканевого повреждения при окислительном стрессе, отражающего уровень патологического белкового метаболизма [190; 237; 249; 265; 267].

Эколого-физиологические и сезонные особенности прооксидантно-антиоксидантного статуса рыб

Для оценки качества водной среды в настоящее время широко применяются методы экологического мониторинга с использованием биохимических маркеров

состояния гидробионтов [103]. Ключевыми неспецифическими параметрами, позволяющими определить функциональный статус организма в условиях антропогенного прессинга, являются активность ферментов АО системы и интенсивность процессов окислительной модификации биомолекул (ПОЛ и ПОБ) [302]. В то же время интерпретация полученных результатов зависит от половых и возрастных особенностей, а также сезонных изменений параметров среды обитания и связанных с ними естественных метаболических флуктуаций (репродуктивной активности биомониторных видов, зараженности паразитами, обеспеченности пищей в течение года, изменением температуры воды и содержания кислорода) [59; 183; 275; 284]. В связи с этим изучение пределов естественной вариабельности биомаркеров в популяциях изучаемых видов является необходимым условием для их корректного применения.

Возрастные особенности

В 1956 году была выдвинута теория свободнорадикального старения, которая постулировала, что АФК, генерация которых усиливается в процессе онтогенеза, являются основным фактором старения клетки [228]. Увеличение содержания продуктов ПОЛ и ПОБ в организме человека и животных с возрастом было показано в работах многих авторов [164; 243; 248].

Одними из важнейших факторов при старении организма является пероксидация липидов и белков. Для многих животных выявлено увеличение доли полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в составе липидов клеточных мембран у представителей старших возрастных групп. Последние (ПНЖК) являются предпочтительным субстратом перекисного окисления, что делает мембраны более чувствительными к ПОЛ [24].

В связи с тем, что карбонилирование белков осуществляется как в результате металкатализируемого окисления, так и под действием продуктов пероксидации липидов, содержание ПОБ отражает не только уровень патологического белкового метаболизма в организме, но и окисления биомолекул в целом. [220; 221; 226]. Таким образом, окислительная модификация белков, в

том числе у рыб, является необходимым физиологическим процессом регуляции белкового обмена, которая увеличивается с возрастом [164; 243], что стимулирует окислительную модификацию биомолекул, включая инактивацию АО ферментов [86; 193]. В то же время снижение интенсивности процессов общего метаболизма в организме животных старших возрастных групп сопровождается снижением синтеза АО ферментов, что также способствует смещению прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону процессов СРО.

Так, в исследованиях на разных пресноводных и морских видах рыб было выявлено снижение активности СОД и КАТ в печени и эритроцитах крови особей старших возрастных групп [192]. Было установлено снижение активности СОД и ГР в печени радужной форели с возрастом [261]. В большинстве случаев активность АО ферментов падала в эритроцитах крови морского ерша, налима, султанки, мерланга и спикары старших возрастных групп [121]. При этом общее содержание модифицированных белков в сыворотке крови морского ерша и мерланга выше у старых рыб по сравнению с молодыми [121]. Подобная тенденция отмечена для *Nothobranchius rachovii*, максимальный срок жизни которой составляет 8,5 месяца. Активность КАТ, ГП, Mn-СОД и Cu, Zn-СОД снижалась, а уровень ПОЛ и ПОБ увеличивался в гомогенатах тканей 7-месячных рыб по сравнению с таковыми у 1- и 4-месячных особей [164].

Половые особенности

Литературные данные, свидетельствующие о наличии межполовых различий в активности АО ферментов и показателей ПОЛ в организме рыб, противоречивы и зависят от видовых особенностей [104; 114], стадии репродуктивного цикла [6; 4], исследуемой ткани [104] и чувствительности к действию отдельных токсикантов [286].

Половые различия процессов перекисного окисления липидов, содержания низкомолекулярных АО и активности АО ферментов были выявлены в гонадах 6 видов черноморских рыб (катрана, ставриды, спикары, барабули, бычка-кругляка и морского ерша) и были связаны с особенностями гормонального статуса

половых желез. Содержание гидроперекисей липидов не различалось в яичниках и семенниках рыб, но проявляло тенденцию к увеличению в гонадах самцов. Уровень ТБК-активных продуктов достоверно выше в семенниках акулы и спикары по сравнению с таковыми показателями яичников. Активность СОД и ПЕР выше в гонадах самцов, чем у самок, тогда как активность КАТ и ГР имела противоположную тенденцию. Как следствие, в яичниках всех исследуемых видов рыб антиоксидантные процессы преобладали над процессами перекисного окисления липидов по сравнению с соотношением этих реакций в семенниках [104].

Активность ГТ в почках самок щук (*Esox lusius*) была значительно выше, чем у самцов [19]. Исследования активности АО ферментов в эритроцитах крови морского налима, султанки, мерланга, спикары, ставриды и морского ерша не показали межполовых различий, за исключением достоверно более высокой активности КАТ у самок мерланга и СОД у самок ерша по сравнению с таковыми у самцов этих видов рыб [114]. Содержание продуктов окисления белков в сыворотке разнополых особей перечисленных выше видов также не отличалось, проявляя тенденцию к увеличению у самцов [121].

Выявленные закономерности, вероятно, зависят от особенностей структуры женских половых гормонов (эстрогенов), обладающих антиоксидантными свойствами. Являясь фенольными соединениями, эстрогены ингибируют свободнорадикальное окисление биологических мембран и липопротеинов, защищают скелетную и сердечную мускулатуры [271], печень [209]. В тканях мозга эту же функцию выполняет прогестерон [208]. В то же время мужской половой гормон – тестостерон, вызывает снижение активности СОД, КАТ и ГП, приводя к усилению свободнорадикального окисления в тканях [187].

В связи с этим состояние прооксидантно-антиоксидантного статуса рыб может зависеть от *стадии полового цикла*. В преднерестовый период ферменты АО системы и процессов биотрансформации наряду с детоксикацией поллютантов осуществляют метаболизм физиологически активных веществ [242], что в значительной степени влияет на активность антиоксидантных ферментов.

Высокое значение каталазы и глутатион-S-трансферазы в печени полосатой камбалы (*Liopsetta Pinnifasciata*) [6] и глутатион-S-трансферазы в печени бельдюги (*Zoarces viviparous*) [278] было обнаружено в преднерестовый период, что связано с интенсивными процессами созревания гонад. Подобная тенденция отмечена для КАТ и СОД у морского ерша и ставриды, а также КАТ, СОД и ГТ у султанки и спикары в преднерестовый период [121].

В то же время значительное снижение активности АО ферментов было установлено в печени тарани (*Rutilus rutilus*) в период нереста. У самок наблюдали увеличение содержания МДА на фоне достоверного снижения активности ГТ, КАТ, СОД и ацетилэстеразы (АцЭ) по сравнению с таковыми показателями у самцов [4]. Значительные изменения активности КАТ, ГП, ГТ и общей концентрации глутатиона в тканях *Anguilla anguilla* были отмечены в период нереста, в октябре [225]. У камбалы (*Platichthys flesus*) из Гданьского залива были также установлены изменения активности биомаркеров в период нереста [245]. Тем не менее, большинство исследований, направленных на изучение сезонных флуктуаций АО ферментов в тканях рыб в условиях антропогенного загрязнения, демонстрируют возможность влияния поллютантов на естественную сезонную динамику состояния биомаркеров рыб [216; 225].

Пищевой рацион

Как известно, интенсивность перекисных процессов в клетках тканей рыб существенно зависит от доли ПНЖК в фосфолипидах мембран и, как следствие, от видовых особенностей их питания и состава липидов корма [18]. Так, в печени белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) содержание диеновых конъюгатов и ТБК-активных продуктов выше, чем у карпа и белого амура (*Stenopharyngodon idella*) на протяжении всего года. Основным кормом белого толстолобика является фитопланктон, липиды которого характеризуются высоким содержанием эйкозопентаеновой ($C_{20:5}$) и докозагексаеновой ($C_{22:5}$) кислот, которые в большей степени поддаются перекисному окислению, чем линолевая ($C_{18:2}$) и линоленовая ($C_{18:3}$) кислоты. Последние составляют основную

долю в рационе питания карпа и белого амура [87]. Зарубежными авторами установлено, что активность СОД и КАТ, а также уровень ПОЛ выше в печени рыб, употребляющих пищу с высоким содержанием липидов [200].

В то же время с кормом в организм рыб попадают низкомолекулярные АО (каротиноиды, витамины С, Е, К) [201; 287] и микроэлементы (Zn, Cu, Se, Mn), входящие в состав активных центров АО ферментов [178; 253; 273]. Обнаружено, что содержание витамина Е в печени карпа в 2-2,5 раза ниже, чем у белого толстолобика и белого амура на протяжении всего года. Данная тенденция выявлена и для витамина А, что связано с высоким уровнем каротиноидов в рационе травоядных видов рыб, которые являются предшественниками ретинола. Однако это почти не влияло на содержание продуктов ПОЛ в печени карпа по сравнению с двумя другими видами рыб, что говорит о высокой эффективности работы АО ферментативной системы [87]. Активность СОД выше у травоядных рыб по сравнению с хищниками и зависит от содержания марганца в пище [191; 219]. Активность каталазы и глутатионпероксидазы ниже, а уровень ПОЛ – выше у травоядных рыб по сравнению с всеядными [191].

В случае дефицита вышеперечисленных компонентов в пище, у рыб происходит нарушение баланса ПОЛ и АО активности, что индуцирует развитие свободнорадикальных патологий [102]. Подобная закономерность распространяется на все живые организмы. Так, несбалансированное питание человека и животных приводит к снижению активности глутатионзависимых ферментов [297]. У подверженных γ -облучению крыс, находящихся на несбалансированной диете, наблюдались более выраженные изменения активности глутатионзависимых ферментов, чем у особей с полноценным питанием [5]. Дефицит цинка в пище радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) приводил к усилению перекисного окисления липидов и изменению активности СОД [264].

Влияние абиотических факторов

Уровень растворенного кислорода в воде. Кислород является жизненно важным для гидробионтов компонентом водной среды, однако биотрансформация этого элемента с образованием АФК делает его токсичным, что связано с развитием окислительного стресса в организме. Было показано значительное увеличение АО реакций у рыб в среде обитания с высоким содержанием растворенного кислорода (РК) и значительным колебанием его концентрации [269].

Однако, не только высокие, но и низкие концентрации кислорода способны стимулировать образование АФК и приводить к изменению активности АО ферментов. На примере низших позвоночных, толерантных к низкому содержанию кислорода в среде, было показано, что реоксигенация тканей после состояния гипоксии/ аноксии сопровождается значительной индукцией процессов СРО, что может вызывать больший стресс для организма, чем сам период гипоксии [179]. Содержание диеновых конъюгатов в печени серебряного карася (*Carassius auratus* L.) возрастало на 114% спустя 1 час после начала реоксигенации и на 75% в мозге через 14 часов постгипоксического периода [263]. При этом в отдельных случаях АО активность увеличивалась в процессе самой гипоксии/ аноксии как адаптивный механизм, упреждающий окислительный стресс в организме. Индукция других ферментов происходила непосредственно в период реоксигенации тканей. У серебряного карася активность Se-зависимой ГП в мозге увеличивалась на 79% в период аноксии, тогда как каталазы в печени - на 38%. [263]. Таким образом, увеличение активности АО ферментов является важным адаптационным механизмом, предотвращающим постгипоксический, физиологически обусловленный окислительный стресс в организме рыб.

Температура и pH среды. На примере глутатионпероксидазы было установлено, что оптимальные значения pH для этого фермента отличаются в зависимости от ткани и объекта исследований, а также температуры инкубационной среды [257]. Для ГП легочной ткани крыс оптимальное значение pH равнялось 8,8-9,0 [189], для ГП эритроцитов человека – 8,5 [173], для

гепатоцитов карпа 8,0-9,0 [258]. Оптимальное значение pH для ГП гепатоцитов печени окуня (*Lateolabrax japonicus*) при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ составило 7,0. Однако, исследования по выявлению устойчивости этого фермента, проводимые на протяжении 60 минут при температуре воды $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, показали сохранение более чем 80% активности энзима в диапазоне pH 6,7-7,5. В то же время ГП вела себя нестабильно при увеличении водородного показателя выше 8,0.

Влияние температуры на активность ГП определяли через 5 минут после инкубации при разных температурах в среде с pH 7,0. Максимальную для этого фермента активность наблюдали при температуре $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Долговременная инкубация (60 мин.) ГП гепатоцитов окуня при разных температурах позволила установить снижение активности фермента на 82% от нормы при этой же температуре ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) [257].

В то же время помимо прямого воздействия, эти параметры способны косвенно влиять на активность АО ферментов. Как известно, интенсивность обмена у многих гидробионтов меняется в зависимости от температуры и сезона года [119; 149]. Низкие зимние температуры могут обуславливать уменьшение метаболической активности, что приводит к изменению интенсивности питания [116] и, как следствие, к снижению субстратного обеспечения синтеза протеинов в печени рыб. Кроме того, в регуляции синтеза АО ферментов важную роль играет гормон гипофиза – мелатонин, продукция которого значительно снижается зимой [87]. В эритроцитах крови черноморской султанки активность КАТ, ГР и ГТ имела минимальные значения зимой по сравнению с другими сезонами. У спикары подобная тенденция установлена для СОД и ГТ, у ставриды только для СОД [121]. В печени карпа, белого толстолобика и белого амура активность СОД и глутатионпероксидазы достоверно ниже зимой по сравнению с летним периодом [87]. Увеличение активности КАТ, ГП, ГТ в тканях *M. cephalus* регистрировали летом, при высоких температурах воды [225].

Влияние биотических факторов

Паразитарная инвазия. Работы, посвященные изучению влияния паразитов на прооксидантно-антиоксидантный статус рыб, демонстрируют увеличение процессов свободнорадикального окисления и изменение активности ферментов у инвазированных особей [77; 124; 111]. Так, изучение особенностей перекисного окисления липидов и антиоксидантной ферментативной системы у лещей (*Abramis brama*) из Рыбинского водохранилища, зараженных плероцеркоидами (*Ligula intestinalis*), показали, что пораженные рыбы отличались от интактных высоким содержанием малонового диальдегида и снижением общей антиокислительной активности [77]. Исследования активности антиоксидантных ферментов тканей черноморского шпрота (*Sprattus sprattus phalericus*) в зависимости от степени инвазии личинками нематоды (*Hysterothylacium aduncum*) позволили установить, что активность КАТ и ПЕР достоверно снижалась с увеличением степени инвазии в тканях рыб [124]. В то же время в работах, проведенных на других объектах, была отмечена противоположная тенденция. Активность КАТ и СОД оказалась в 1,5 раза выше в эритроцитах крови мерланга, инвазированного нематодой. Для ПЕР и ГР достоверных отличий в эритроцитах крови рыб двух групп не установлено. Активность ГТ у инвазированных особей мерланга более чем в 4 раза превосходит этот показатель у здоровых рыб [123]. Таким образом, в организме зараженных рыб происходит нарушение метаболических функций, что стимулирует активацию свободнорадикальных процессов и может быть одной из причин серьезных нарушений гомеостатических функций организма хозяина [77; 112; 123].

Микробиологическое загрязнение. Бактерии играют неоднозначную роль в жизни рыб, выступая, с одной стороны, как компоненты нормальной микробиоты, принимающей активное участие в пищеварительных процессах, а с другой – как возбудители болезней. Продуцируемые патогенными микроорганизмами бактериальные эндотоксины попадают в организм и вызывают токсикоинфекции [92]. Сведения, касающиеся влияния микробного загрязнения на прооксидантно-антиоксидантный статус рыб, весьма ограничены. В то же время имеются данные,

свидетельствующие об увеличении восприимчивости организма рыб к возбудителям токсикоинфекций в условиях повышенной антропогенной нагрузки в среде обитания [167; 185], что стимулирует прооксидантные процессы в клетках.

Таким образом, прооксидантно-антиоксидантный статус рыб существенно зависит от физиологического состояния особей, сезонных изменений гидрохимических характеристик воды и особенностей биологии вида, что необходимо учитывать в биомониторинговых исследованиях при оценке качества водной среды.

Применение биомаркеров рыб для оценки состояния водной среды

Состояние водных экосистем в большей степени, чем наземных, зависит от влияния антропогенных факторов, что говорит о высокой чувствительности гидробионтов к нарушению химического состава среды обитания [82].

В настоящее время актуальной проблемой является изучение влияния этих факторов на экосистему Азово-Черноморского бассейна. Особое внимание исследователей привлечено к шельфовым зонам, в которые с промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми сточными водами попадает широкий спектр загрязняющих веществ [84; 108], отрицательно влияющих на функционирование прибрежных ихтиоценозов. Химическое и биологическое загрязнение воды и грунтов приводит к снижению биоразнообразия, продолжительности жизни рыб, нарушению процессов репродукции и сокращению численности видов [84; 85; 91; 128; 150]. В связи с этим, большое внимание уделяется поиску и изучению биологических маркеров, эффективно отражающих состояние рыб и качество среды их обитания.

Как известно, наличие ксенобиотиков в среде запускает сложный механизм их детоксикации, в результате которого происходит образование АФК, способных повреждать биологические молекулы [75]. Смещение равновесия между прооксидантно-антиоксидантными процессами в сторону СРО принято

считать сигналом для запуска стресс-реакции, что представляет неспецифическую форму ответа организма на действие неблагоприятных факторов среды и выражается в индукции антиоксидантной активности [10; 14]. В то же время в условиях «окислительного стресса» возможна инактивация энзимов. Этот процесс осуществляется как при непосредственном повреждении генетического материала, ответственного за синтез белков, так и за счет процессов окислительной модификации белковых молекул, следствием чего является нарушение его пространственной конфигурации и дальнейший протеолиз [10]. В связи с этим активность АО ферментов и показатели окислительной модификации белков можно рассматривать как ранние биохимические маркеры, способные адекватно и оперативно отражать состояние прооксидантно-антиоксидантного равновесия в тканях рыб и уровень патологического белкового метаболизма при «окислительном стрессе».

Среди загрязнителей, регулярно попадающих в морскую среду, наиболее опасными являются нефтепродукты, пестициды и тяжелые металлы.

В составе жидкого топлива и в продуктах его деградации присутствует смесь различных полиароматических углеводородов (ПАУ), которая может вызывать токсический эффект у гидробионтов. Наиболее известным и одним из самых опасных представителей группы ПАУ является бензпирен – мощный канцероген, образующийся при сгорании углеводородного топлива. Особенностью метаболизма бензпирена в живых организмах является то, что в результате его детоксикации под действием ферментов I фазы биотрансформации образуется еще более токсичный канцероген – дигидроксиэпоксид, способный встраиваться в молекулы ДНК и стимулировать как мутагенез, так и канцерогенез. В связи с этим особое значение приобретает его дезактивация, выполняемая ферментами II фазы биотрансформации (ГТ) посредством присоединения к глутатиону [19]. Так, в исследованиях, проведенных на мраморном клариасе (*Clarias gariepinus*), было показано, что содержание рыб в воде с небольшими концентрациями бензпирена (до 5 мг/кг) не приводило к индукции активности EROD и ГТ, тогда как при дозе 5 мг/кг значительное

увеличение активности EROD развивалось уже на первый, а ГТ – на третий день воздействия. При этом более выраженный ответ был отмечен у самок по сравнению с самцами, что, вероятно, свидетельствует о большей их устойчивости к загрязнению ПАУ [212; 238]. В то же время установлены значительные различия в действии бензпирена на активность ГТ у разных видов рыб, что может быть связано с наличием высокой субстратной специфичности изоферментов семейства ГТ и отсутствием у некоторых видов изоформ ГТ, активных в отношении оксидов ПАУ [231]. Так, активность ГТ увеличивалась в тканях рыб, подвергшихся воздействию бензпирена [160; 184; 266], в других случаях – изменялась незначительно или оставалась одинаковой [196; 210].

В свою очередь интоксикация продуктами нефтеуглеводородов стимулирует окислительный стресс в организме [166], что вызывает отклик со стороны антиоксидантной ферментативной системы организма. У нильской тилапии *Oreochromis niloticus*, подвергшейся воздействию сырой нефти, было установлено увеличение активности СОД, КАТ, ГТ и ПОЛ на 15 и 30 день эксперимента [222]. Увеличение активности СОД и КАТ в присутствии нефтепродуктов в среде было отмечено в работах других авторов, что свидетельствует о тандемности этих ферментов, осуществляющих первую линию защиты при окислительном стрессе [204; 206; 288]. В то же время достоверное увеличение активности глутатионзависимых ферментов (ГР, ГТ) было отмечено в печени *Thalassophryne maculosa* в присутствии сырой нефти в воде [251]. Активность ГР и КАТ возрастала, а ПЕР – снижалась у молоди черноморской кефали-остроноса через сутки инкубации в воде с концентрацией соляра – 2,5 и 5 мл/л [147].

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) наряду с диоксинами и ртутью называют «суперэкоотоксикантами XXI века», что связано с их чрезвычайной устойчивостью в природе и способностью передаваться по пищевым цепям, накапливаться с эффектом усиления на верхних ступенях трофической пирамиды [19]. Многочисленные исследования позволили установить индукцию процессов пероксидации в результате внедрения ПХБ в метаболизм и активацию I и II фаз

биотрансформации ксенобиотиков [172], а также антиоксидантной системы. Так, при воздействии смеси ПХБ «Clophen A40» на самок камбалы (*Pleuronectes platessa*) активность цитохрома Р-450 увеличивалась на 10-е сутки, тогда как ГТ – на 16-й день, что говорит о независимости процессов их активации [188]. В то же время токсическое действие ПХБ на организм зачастую выражается в ингибировании активности антиоксидантных ферментов. Снижение уровня СОД в гонадах черноморской султанки было выявлено при содержании особей в воде с препаратом «Арохлор 1254» в концентрации 5 мг/л [110]. Активность КАТ в почках и печени золотой рыбки (*Carrasius auratus*) также снижалась под действием гербицида аминотриазола [175]. Установлено, что индукция или ингибирование активности антиоксидантных ферментов зависит от концентрации токсиканта и времени экспозиции, что справедливо для ксенобиотиков любой природы. В эксперименте на змееголове пятнистом (*Channa Punctatus*), подвергнутому воздействию гербицида атразина (4,2, 5,3 и 10,6 мг/л), содержание ТБК-активных продуктов, а также активность СОД и ГР в печени рыб увеличивались вместе с увеличением концентрации токсиканта и временем воздействия. Обратная тенденция отмечена для КАТ, активность которой незначительно возрастала на 5-е сутки и снижалась, начиная с 7-х [301]. Действие пестицидов и фунгицидов разной природы стимулирует процессы окислительной деградации белков [168; 204; 267].

Как известно, токсическое действие одних металлов (свинец, ртуть, кадмий, мышьяк) заключается в нарушении биохимических процессов посредством связывания функциональных групп белков (-SH) или вытеснения микроэлементов из активных центров ферментов [30; 81]. Действие других элементов (с переменной валентностью) обусловлено их способностью вовлекаться в окислительно-восстановительные циклы [20]. В обоих случаях, прямо или опосредованно, ТЭ приводят к интенсификации процессов СРО и, как следствие, индукции защитных систем организма. Так, инъекция хлорида кадмия (200 мг/кг) морскому карасю (*Sparus aurata*) привела к увеличению активности EROD и ГТ в печени рыб [161]. Активность ГТ в печени ельца (*Leuxiscus alburnoides*) из

водоема с повышенным содержанием Cu и Se – (60-110 нМ) и (200 нМ) соответственно, была выше по сравнению с таковой у рыб из экологически чистой зоны [275]. В то же время кривые зависимости активности ГТ от концентрации металла имеют выраженную колоколообразную форму, когда при увеличении дозы металла активность фермента сначала возрастает, а затем снижается, что было показано в эксперименте при действии меди на *Carassius auratus* [199]. Низкие концентрации цинка не вызывали изменения активности АО ферментов и содержания небелковых тиолов в печени карпа относительно контроля, тогда как высокие его концентрации угнетали активность СОД и МТ в гепатоцитах печени, усиливая образование продуктов окислительной деструкции белков и липидов. В то же время ионы свинца вызывали окислительный стресс уже при низких его концентрациях в организме карпа. В печени снижалась активность СОД и КАТ, что приводило к значительному увеличению окислительного повреждения белков и липидов [137].

С учетом вышеизложенного, активность АО ферментов и показатели ОМБ являются эффективными биомаркерами состояния рыб и качества среды их обитания.

Однако неясным на сегодняшний день остается вопрос о степени влияния каждого из действующих факторов (антропогенных и природных) на формирование прооксидантно-антиоксидантного статуса крови рыб из районов обитания, характеризующихся разными экологическими условиями.

1.1.3 Характеристика белкового состава сыворотки крови рыб

Белки сыворотки крови являются многофункциональной динамичной системой, где происходит интеграция обменных процессов организма. Благодаря своей амфотерности белки сыворотки крови поддерживают буферность среды и постоянство рН, осуществляют транспорт различных метаболитов в русле крови, препятствуют оседанию эритроцитов, служат резервом аминокислот при синтезе

тканевых белков и участвуют в свертывании крови. γ -глобулины выполняют защитные функции организма [136; 142].

В сыворотке крови содержится большое число простых и сложных белков. В настоящее время с помощью электрофоретических, хроматографических, иммунохимических методов обнаружено более 100 индивидуальных белков. Биологические функции однотипных белков в основном совпадают у представителей разных классов животных, хотя могут быть некоторые отличия в физических, химических, иммунологических и генетических свойствах [142].

Характеристика отдельных белков сыворотки крови

Преальбумин – белок сыворотки крови, обладающий наиболее высокой электрофоретической подвижностью. Содержание в сыворотке крови человека и животных невелико 10-15 мг%. Молекулярная масса (Мм) в среднем 50-53 кДа [136].

Преальбумин образует комплекс с ретинолсвязывающим белком (РСБ) и транспортирует в русле крови ретинол, а также тиреоидные гормоны [142].

Альбумин (Alb) высших позвоночных представляет собой мономер – низкомолекулярный белок с Мм 67-69 кДа. Он не содержит в структуре углеводный компонент и имеет свободную поверхностную SH-группу [136; 186].

Считается, что типичные альбумины, характерные для млекопитающих и человека, присутствуют только у хрящевых ганоидов, а у хрящевых и костистых рыб – альбуминоподобные белки [65]. Альбумины осетровых рыб имеют молекулярную массу 67-74 кДа и, видимо, представляют собой момеры. Молекулы альбумина хрящевых ганоидов не содержат в своей структуре ковалентно связанного углевода и обладают одной поверхностной SH-группой. Особого внимания заслуживает тот факт, что альбумины хрящевых ганоидов взаимодействуют со всеми красителями, специфичными для альбумина человека (бромкрезоловый пурпурный, бромфеноловый синий и синька Эванса), сдвигая λ_{\max} от 590 к 606 нм. В отличие от хрящевых ганоидов, альбумины костистых рыб

содержат в своей структуре ковалентно связанный с белком углевод, что принято рассматривать как признак примитивности. Далее, на примере леща установлено отсутствие поверхностных и скрытых внутри глобулы SH-групп, а также неспецифическое связывание с бромкрезоловым пурпурным, тогда как с бромфеноловым синим и синькой Эванса связывания не выявлено [153].

Альбумин связывает и транспортирует ряд естественных метаболитов (длинноцепочечные жирные кислоты, билирубин, гормоны, пигменты, анионы металлов и др.) [136; 214; 247; 290], ядовитых веществ (фенолы, производные индола, полициклические углеводороды, лизолецитин и др.) [33; 62; 142]. Alb проявляет антиоксидантные свойства в результате взаимодействия с гидроксильным радикалом, образующимся в реакции Фентона при участии H_2O_2 с Fe^{2+} и тем самым защищает от окисления ферменты [227]. Alb может выступать как запасной белок, являясь резервом аминокислот для различных тканей [53; 142; 151].

Гаптоглобин (Hr) человека - гликопротеид, содержащий 20% углеводов и входящий в состав α_2 -глобулиновой фракции [136; 141]. Как специализированный белок впервые появился у позвоночных в группе костистых рыб [83; 43]. Исследования на 4 видах рыб семейства *Catastomidae* показали наличие одного типа молекул Hr различия в электрофоретической подвижности, которых обусловлены наличием двух типов комплексов Hr-Hb (в первом типе соотношение 1:1, во втором – 1:2) [244]. В то же время гаптоглобины костистых рыб по своей природе не идентичны гаптоглобинам человека и содержание их в сыворотке крови рыб значительно более низкое по сравнению с человеком и другими млекопитающими.

Hr образует специфические стабильные комплексы с гемоглобином (Hb), что препятствует потере железа через почки. Кроме того, комплекс Hr-Hb играет существенную роль в катаболизме Hb и гема [136; 244].

Церулоплазмин (Cp) – голубой, медьсодержащий белок α -глобулиновой фракции сыворотки крови. Молекулярная масса Cp составляет 120-160 кДа,

колебания этого показателя связаны с разным содержанием углеводных компонентов, на долю которых может приходиться от 2 до 8% [136].

Ср обеспечивает транспорт и утилизацию меди в организме, а также служит сильным ингибитором образования гипогалоидов и является аналогом СОД в межтканевых жидкостях, обезвреживая O_2^- [15]. Ср обладает окисидазной активностью, катализирует процесс окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} , которое взаимодействует с трансферинном [136].

Трансферин (Tf) человека – сложный железо-гликопротеидный комплекс β -глобулиновой фракции сыворотки крови. Молекулярная масса Tf 75-80 кДа [136].

У рыб, в отличие от Нр, Tf обнаружен у всех групп (хрящевые, хрящевые ганоиды, костистые рыбы). На протеинограммах, так же как и у человека, он мигрирует в зоне β -глобулинов. Обычно это мономер с молекулярной массой 70-80 кДа [270], в состав которого входит углевод. Tf осетровых содержит большое количество сиаловых кислот по сравнению с таковым у высших позвоночных (6,7 моля против 4,0 моля на 1 моль белка соответственно) [233].

Tf обратимо связывает и транспортирует ионы железа от мест его адсорбции в клетках эпидермиса тонкого кишечника к месту его потребления (ретикулациты), осуществляет перенос железа в клетки печени. Tf взаимодействует с железом, образовавшимся при распаде гемоглобина [136].

Если транспортная, резервная и регуляторная функции присущи как альбуминам, так и глобулинам, то защитная функция организма определяется исключительно глобулинами, а именно - **иммуноглобулинам (Ig)**. Последние представляют гетерогенную систему сывороточных белков γ -глобулиновой фракции, синтезируемых в организме человека и животных в ответ на появление чужеродных для организма белков – антигенов.

У высших позвоночных выделяют 5 групп иммуноглобулинов, различающихся по электрофоретической подвижности, молекулярной массе, составу и иммунологическим свойствам (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) [135].

Иммуноглобулины рыб относятся преимущественно к макроглобулиновому типу IgM, которые по мнению ряда исследователей, являются более древними. У рыб иммуноглобулины имеют более компактную структуру, что затрудняет взаимодействие поливалентных антител с антигенами и обуславливает слабую специфичность синтезированных антител [39].

Эколого-физиологические и сезонные особенности белков сыворотки крови рыб

Сывороточные белки способны отражать особенности физиологического состояния особей, обусловленные влиянием экзо- и эндогенных факторов [39; 66]. В наибольшей степени на белковый состав сыворотки крови рыб влияют филогенетическое положение вида, пол и возраст особей, а также сезон года, особенности питания и биологии вида.

Филогенетическое положение вида

Сывороточные белки рыб высоко гетерогенны, а именно дифференцированы по электрофоретической подвижности, причем гетерогенность увеличивается в ряду хрящевые → хрящевые ганоиды → костистые рыбы [67].

У низших хордовых и беспозвоночных сывороточного альбумина нет, тогда как у миноги появляется альбуминоподобный белок, но, в отличие от альбуминоподобного белка рыб, он еще не способен связывать жирные кислоты [136].

В то же время наличие альбуминоподобных белков у каспийской миноги и отсутствие их у отдельных видов хрящевых рыб (морской кот, морская лисица), наряду с имеющимися данными о наличии альбуминов в раннем онтогенезе у этих видов, позволило сформулировать гипотезу об «утере» хрящевыми рыбами альбуминов в результате обратной морской миграции в конце силурийского периода. Она стала возможной благодаря приобретенной способности хрящевых

удерживать в тканях большие количества мочевины, обеспечивающей осмотическое давление крови. В то же время в сыворотке крови катрана были выявлены белки с электрофоретической подвижностью альбуминов человека и млекопитающих. Однако по ряду физико-химических свойств они существенно отличались от альбуминов высших позвоночных. Так, альбумин катрана содержит ковалентно связанный с белком углевод, не образует специфический комплекс с красителем бромкрезоловым пурпурным, но связывается с гемом и синькой Эванса [65].

Таким образом, среди позвоночных животных надкласс рыб занимает особое положение, так как именно у рыб появляется альбуминоподобный белок, структурные преобразования в котором позволяют выполнять транспортную функцию [8; 65]. В сыворотке крови рыб преобладают глобулины, тогда как у млекопитающих более 50% белков сыворотки крови приходится на альбумин. Отношение альбумина к глобулинам у рыб значительно ниже, чем у высших позвоночных. Это связано с выходом последних на сушу, в результате чего у наземных позвоночных функцию поддержания осмотического давления крови выполняет альбумин [113].

В то же время у позвоночных в группе костистых рыб впервые появился специализированный белок гаптоглобин [9; 43; 83]. У представителей хрящевых рыб и хрящевых ганоидов гаптоглобин обнаружить не удалось, что авторы рассматривают как физиологическую агаптоглобинемию [68]. Однако вопрос о возможных механизмах компенсации гаптоглобинемии, предохраняющих этих рыб от гемоглобиноурии, остается открытым, что побуждает многих исследователей работать в этом направлении. Так, было выдвинуто предположение, что пероксидазная активность в сыворотке крови хрящевых рыб (катран) связана с трансферрином и способностью белков низкомолекулярной фракции к связыванию продукта деструкции гемоглобина – гема. У хрящевых ганоидов (стерлядь, севрюга, белуга) пероксидазную активность проявляли компонент α_1 -глобулиновой области и трансферрин. Увеличение количества белков с пероксидазной активностью в группе костистых рыб является

физиологической стратегией организма, направленной на предотвращение потери железа ввиду повышенной склонности эритроцитов костистых к внутрисосудистому гемолизу и неустойчивостью гемоглобина к действию дестабилизирующих факторов [9].

Сравнение электрофоретического состава металло- и липопротеидов сыворотки крови черноморского катрана и некоторых видов костистых рыб позволило установить ряд отличий. Коэффициенты подобия между всеми исследуемыми компонентами костистых рыб имели более высокие значения, чем между костистыми и хрящевыми. Установлено, что липопротеидный спектр сыворотки крови катрана менее гетерогенен по числу фракций, чем у костистых, и включает 4 компонента против 6-9 соответственно [105].

Половые и сезонные особенности

Белковый состав сыворотки крови самок и самцов рыб относительно стабилен на протяжении всего года, за исключением периода созревания гонад и нереста. В это время различия наблюдаются как в относительном, так и в абсолютном содержании всех белковых фракций [56; 98].

Так, в период активного созревания гонад и нереста у бычка-кругляка половой деморфизм проявляется особенно четко, что обусловлено спецификой биологии размножения этого вида. У нерестящихся самцов уровень сывороточного белка ниже, что объясняется прекращением питания в период размножения и активной охраной гнезда. В то же время, несмотря на усиленный откорм самок, уровень общего белка в сыворотке их крови неуклонно снижается, достигая минимума в июле, что связано с большим расходом белков на формирование крупных, богатых питательным материалом овоцитов. При этом установлено, что уменьшение концентрации сывороточного белка в период созревания гонад происходит в основном за счет альбумина, основного пластического материала [53; 63; 151]. Как следствие, уровень альбумина снижается в сыворотке крови самок и самцов бычка-кругляка в период нереста. Другие сывороточные белки, относящиеся к β -зоне, образуют с липидами

растворимые комплексы, облегчая их транспорт к другим органам и тканям. Значительное их снижение в сыворотке крови нерестящихся самцов кругляка является следствием вынужденного голода, когда содержание липидов в тканях и органах существенно снижено. Обратная тенденция наблюдается у самок бычка-кругляка. Процентное содержание β -глобулинов в сыворотке их крови значительно увеличивается в преднерестовый и нерестовый периоды [56].

Увеличение доли тяжелых глобулиновых фракций у самок в период созревания гонад связано с появлением в крови нового белкового комплекса, богатого липопротеидами – сывороточного *вителлина* [90; 197]. Сывороточный вителлин в крови созревающих самок нерки идентичен белкам ее икры, в которой он накапливается в больших количествах. Предполагают, что он является запасным питательным белком. Интенсивный синтез вителлина происходит после начала большого роста овоцитов в период вителлогенеза, что соответствует началу IV стадии зрелости гонад [246].

Различия в концентрации сывороточного белка крови и процентном содержании белковых фракций были также установлены в преднерестовый и нерестовый периоды у других видов рыб. Так, концентрация общего белка и сывороточного альбумина в период созревания гонад были выше в сыворотке крови самок судака [53] по сравнению с таковыми у самцов этого вида.

Содержание альбумина уменьшалось, а доля α_1 - и α_2 -глобулинов возрастала в сыворотке крови самцов белого толстолобика в период нереста. У самок этого вида концентрация альбумина также снижалась в период созревания гонад, тогда как в липопротеидной области появлялась дополнительная белковая фракция. В то же время общее количество белка в крови самок и самцов белого толстолобика практически не менялось [1].

Возрастные особенности

Сравнение количественного соотношения белковых фракций сыворотки крови белого толстолобика показало уменьшение альбуминов у рыб с возрастом (у самцов доля альбуминов в крови снижается от 41% у сеголеток до 30% у

двухлеток). Закономерных изменений в содержании остальных белковых фракций в сыворотке крови рыб разного возраста не обнаружено [1]. Снижение уровня α -глобулинов и увеличение β -глобулинов было отмечено у севрюг старшей возрастной группы. При этом соотношение А/Г оставалось неизменным [60]. Сокращение доли альбуминов было также установлено в крови у радужной форели с возрастом [90]. Выявленная особенность является следствием снижения интенсивности обменных процессов в организме старых рыб и, как следствие, белоксинтезирующей функции печени. В то же время изменения в картине крови, связанные с процессами созревания гонад или с питанием, значительно перекрывают возрастные различия [99].

Пищевой рацион

На примере черноморской ставриды было показано, что концентрация белков в сыворотке находится в прямой зависимости от накормленности рыб [57]. Будучи белковым резервом организма, сывороточный альбумин в значительной степени расходуется на поддержание азотного баланса при голодании рыб. При интенсивном откорме уровень альбумина в сыворотке крови рыб увеличивается быстрее других фракций [151]. Аналогичная тенденция отмечена для β -глобулиновой зоны. Во время зимовки процент β -глобулинов снижается в сыворотке крови бычка-кругляка вместе с активностью питания, тогда как в период весеннее-летнего откорма содержание сывороточных липидов увеличивается вместе с концентрацией β -глобулинов [56]. У голодающих карпов к концу трехмесячного содержания в садках наблюдали снижение количества альбумина и повышение концентрации глобулиновых фракций. Подобная тенденция отмечена для голодающих линей [60].

Биология вида

Активные подвижные рыбы имеют более высокий уровень белка в крови (5,5-5,8 г %), чем малоподвижные (3,4-4,0 г %) [151]. Содержание β -глобулинов

особенно велико в крови рыб, совершающих далекие миграции, что связано с высоким жировым обменом у этих видов [53].

Таким образом, концентрация сывороточных белков, а также гетерогенность электрофоретического спектра существенно зависят от филогенетического положения вида. Система сывороточных белков способна чутко реагировать на изменения интенсивности и направленности обменных процессов, обусловленные стадией репродуктивного цикла и возрастом особей, а также сезонностью и экологическими особенностями вида.

Влияние антропогенных факторов на белковый состав сыворотки крови рыб

Наряду с вышеперечисленными свойствами системы сывороточных белков, неспецифические изменения в белковой картине крови могут отражать физиологическое состояние организма в стрессовой ситуации, в том числе при действии неблагоприятных факторов среды. В этом случае белки могут быть использованы в качестве маркеров, позволяющих уже на ранних этапах развития патогенных процессов оценить степень нарушений в организме рыб [17; 106; 107].

В настоящее время принято считать, что в основе изменений, происходящих в ЭФ-спектре сывороточных белков, в результате включения ксенобиотиков в обмен, лежат два механизма [106]:

1. изменения, являющиеся следствием действия антропогенных факторов на генетический аппарат гидробионтов и приводящие к изменениям физико-химических свойств белков в результате мутаций и нарушений в процессах биосинтеза белков;
2. изменения, связанные с непосредственным модифицирующим действием антропогенных факторов на белки.

В первом случае избыток ксенобиотиков в среде обитания приводит к нарушению генетических структур и, следовательно, изменениям процессов

биосинтеза белков. Так, содержание *Oreochromis mossambicus* в среде с афлатоксином позволило установить изменения в экспрессии генов и, следовательно, биосинтезе их продуктов – белков. Выявленная особенность основана на способности ксенобиотиков, в данном случае афлатоксина, ковалентно связываться с молекулой ДНК, что ингибирует процессы ее репликации, а также синтез РНК и трансляцию белков [309].

Второй механизм основан на непосредственном взаимодействии ксенобиотиков и их метаболитов с белками, что приводит к изменению их физико-химических свойств и появлению новых компонентов, нехарактерных для интактных особей – посттрансляционные модификации [106].

Снижение количества белковых фракций в ЭФ-спектре, изменение их относительной электрофоретической подвижности и перераспределение фракций между различными зонами ЭФ-спектров сывороточных белков рыб было выявлено при действии комплексного загрязнения среды обитания [17; 106; 213] и отдельных токсикантов в условиях эксперимента на организм гидробионтов [106; 107; 299].

Сокращение числа белковых компонентов наблюдали в ЭФ-спектрах сыворотки крови скорпены и султанки при содержании в среде с ПХБ [106], в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови бычка-кругляка при действии гамма-излучения [109], а также в ЭФ-спектрах белков икры и личинок бычка и собачки, подвергнутых непрямому и прямому действию нефти [106].

Снижение гетерогенности ЭФ-спектра белков сыворотки крови бычка-кругляка было выявлено в 90-е годы, характеризующиеся усилением антропогенной нагрузки в Севастопольской бухте по сравнению с 80-ми годами.

Отдельного внимания заслуживает увеличение относительной ЭФ-подвижности альбуминовой фракции в сыворотке крови рыб, исследуемых в более поздний период. Аналогичная тенденция прослеживалась для султанки и скорпены, содержащихся в протоке, аквариуме и аквариуме с сублетальными концентрациями ПХБ. По результатам исследований Кэф альбумина увеличивался у особей, находившихся в аквариуме, по сравнению с протоком,

тогда как у опытных рыб этот показатель снижался до значений, характерных для интактных [106]. Некоторое увеличение относительной электрофоретической подвижности альбумина и появление второго компонента в альбуминовой зоне были отмечены у самок и самцов бычка-кругляка при гамма-воздействии [107].

В то же время на фоне снижения общего количества белковых фракций в ЭФ-спектрах рыб, подвергнутых действию различных токсикантов, прослеживались однотипные реакции со стороны системы сывороточных металлопротеидов, которые выражались в появлении дополнительных железосодержащих фракций [106; 107]. Как известно, одним из важнейших компонентов сывороточных железосодержащих белков является пероксидаза – АО фермент, разлагающий перекиси – продукты свободнорадикальных реакций. Таким образом, появление дополнительных железосодержащих фракций может быть следствием интенсификации синтеза этих белков, обусловленной присутствием токсикантов в среде обитания и, следовательно, смещением прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону процессов СРО [106].

Другими сывороточными белками, проявляющими антиоксидантные свойства, являются медьсодержащие белки типа церулоплазмينا. При гамма-облучении дозой 2 Гр в период 3-10 дней в сыворотке крови наблюдали увеличение числа медьсодержащих компонентов. Действие ПХБ в течение суток приводило к резкому снижению Кэф быстрой медьсодержащей фракции в сыворотке крови султанки и скорпены, тогда как изменения в числе белковых фракций установлены только у скорпены [106].

Выявленные в экспериментальных условиях изменения липопротеидного состава, при действии различных токсикантов, являются следствием изменения комплексообразовательной способности этих компонентов, что, по мнению автора, обусловлено усилением процессов ПОЛ, вызванных общей интоксикацией организма. Следствием интенсификации окислительных процессов, вероятно, является и насыщение ЭФ-спектров гомогенными диффузными компонентами, что приводит к нарушениям структуры белков, появлению конформеров и агрегатов [106].

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что снижение числа белковых фракций в ЭФ-спектрах рыб преимущественно наблюдается в преальбуминовой зоне. Выявленная особенность, вероятно, свидетельствует о том, что синтез преальбуминов наиболее подвержен модифицирующему влиянию токсикантов [106]. В клинической лабораторной практике было установлено, что болезни, протекающие с патологическими изменениями в печени пациентов, приводят к редукции преальбуминовых фракций. В 30 % случаев у пациентов с поражением печени наблюдали снижение уровня преальбуминов, тогда как уровень альбумина находился в пределах нормы. Выявленная особенность позволила авторам предположить, что преальбумины могут быть более информативными на ранних этапах развития патологии печени, чем даже альбумин [229].

Наряду с вышеперечисленными качественными изменениями в ЭФ-спектре белков рыб при действии токсикантов, количественные изменения общей концентрации белка и отдельных фракций в сыворотке крови рыб были также установлены и применяются в качестве биомаркеров. Однако в отличие от однотипных реакций, происходящих в ЭФ-спектрах (снижение числа белковых фракций, увеличение железосодержащих компонентов в спектре и т.д.) в ответ на действие токсичных веществ, показатель общей концентрации изменяется неоднозначно, что зависит от природы воздействия, времени экспозиции и адаптивных возможностей вида. Так, увеличение дозы гамма-облучения бычка-кругляка привело к возрастанию концентрации белка сыворотки крови, тогда как число белковых фракций в электрофоретическом стандартном спектре снизилось [107]. Увеличение уровня общего белка было установлено при содержании морского окуня (*Llates calcarifer*) в садках с концентраций нитритов в воде 30-80 мг/л в течение четырех дней [306]. При действии нефти в концентрациях 0,05-0,24 мг/л наблюдали увеличение содержания общего белка и глобулинов в сыворотке крови тиляпии (*Tilapia mossambica*), тогда как уровень альбумина снижался [207]. Увеличение значений общего белка, альбуминов и глобулинов было показано в сыворотке крови карпа (*Hypophthalmichthys molitrix* F.) при действии сточных вод и высокой плотности содержания рыб в садках в течение 12 недель [240]. В то же

время исследования, посвященные влиянию пестицидов и хлорорганических соединений на белковый обмен рыб, позволили установить ингибирование белоксинтезирующей функции. Сублетальные концентрации хлорфона приводили к снижению концентрации общего белка у *Oreochromis niloticus* [300], ПХБ – у камбалы (*Scophthalmus maximus*) [234]. Снижение уровня общего белка, альбуминов и глобулинов было выявлено в сыворотке крови сома (*Clarias batrachus*) при действии карбарила и фората [239], а также в сыворотке крови *Clarias gariepinus* при действии эндосульфана в течение 60 дней [308].

Существенное влияние на белковый профиль сыворотки крови оказывают паразитарная инвазия и патогенные микроорганизмы. В исследованиях, проведенных на треске (*Gadus morhua maris-albi*) из Белого моря, было установлено, что интенсивность инвазии, превышающая 10 гельминтов на особь, и доминирование в кишечнике бактерий рода *Pseudomonas* приводят к увеличению уровня преальбуминов и глобулинов, а также снижению альбуминов в сыворотке крови рыб. Поражение вирусной, бактериальной и смешанной инфекциями вызывает у карпов, выращенных в искусственных условиях, специфические изменения в белковом составе крови. При вирусной инфекции в составе сыворотки крови увеличивается фракция глобулинов, снижается содержание альбуминов и преальбуминов. При бактериальной инфекции возрастает содержание фракции альбуминов и преальбуминов, смешанная инфекция сопровождается снижением в сыворотке крови фракции γ -глобулинов и повышением фракции альбуминов [71].

Таким образом, неспецифические изменения в белковом спектре крови рыб (качественные и количественные), являются информативными биомаркерами физиологического состояния рыб и качества среды их обитания.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика объекта исследований

Объектом исследования служил бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814)) (Perciformes; Gobiidae) (Рисунок 2.1), отловленный в трех севастопольских бухтах (Мартыновой, Карантинной, Стрелецкой) и двух районах юго-западной части Азовского моря (с. Мысовое, с. Семеновка). 193 экземпляра черноморского бычка-кругляка было проанализировано в 2003-2005 гг. и 285 – в 2009-2012 гг. В Арабатском заливе Азовского моря 183 рыбы были исследованы в 2003 г. и 241 – в 2011-2012 гг.



Рисунок 2.1 Бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814))

Бычок-кругляк – самый массовый представитель сем. Gobiidae из обитающих в Азовском и Черном морях. В Азовском море он относится к важным промысловым видам, а в Черном море – к объектам кустарного и любительского лова. В 50-е годы прошлого столетия бычок-кругляк составлял до 90 % общего годового улова рыбы, но, в связи с резким ухудшением условий жизни в обоих морях в результате хозяйственной деятельности человека, произошли негативные изменения и в фауне [37; 44]. В Азовском море нерегулируемый вылов рыбы на нерестилищах и в местах нагула на фоне ухудшения экологической ситуации

привел к резкому сокращению численности бычка-кругляка и падению его уловов в 40 раз по сравнению с уловами в 1950-1960-е годы. Снизилась численность этого вида и в Черном море [97].

Бычок-кругляк отличается необыкновенной эврибионтностью, позволяющей ему выживать в резко различающихся экологических условиях [79]. Эта особенность бычка-кругляка позволила ему в условиях антропогенного загрязнения мест его традиционного обитания перейти к расширению своего ареала и к поиску новых экологических ниш [29; 130].

Бычок-кругляк в Азовском море обитает повсеместно, а в Черном – в прибрежных участках. Питается преимущественно моллюсками, червями, в меньшей степени ракообразными [116]. Созревает в возрасте 1 года. Нерестится с апреля по август включительно. За этот период самка откладывает до 6 порций икры [98]. Икра бычка-кругляка крупная (около 4 мм по продольной оси), яйцевидной формы. Самка откладывает ее на участки камней, очищенные самцом от грязи и обрастаний. Самец охраняет, аэрирует и чистит кладку весь период инкубации. Из икры вылупляются сформированные мальки с небольшим желточным мешком, способные на следующий день после выклева перейти к экзогенному питанию [41; 79].

Размерно-массовые и морфофизиологические характеристики самок и самцов бычка-кругляка, обитавших в Черном и Азовском морях в разные периоды исследования, представлены в таблице 2.1.

Как известно, физиологическое состояние особи (возраст, пол, стадия зрелости гонад) влияет на значения морфофизиологических характеристик. В связи с этим изучение индекса печени (ИП), гонадосоматического индекса (ГСИ) и упитанности (Упит.) проводили на самках и самцах одного возраста (2 и 3 года) в единый период репродуктивной активности (нерест).

Таблица 2.1 Размерно-массовые и морфофизиологические характеристики самок и самцов бычка-кругляка из прибрежной зоны Черного и Азовского морей в разные периоды времени

Параметры	Черное море		Азовское море	
	2003 г. 2009-2012 гг.		2003 г. 2011-2012 гг.	
	самки	самцы	самки	самцы
1	2	3	4	5
Количество особей, n	<u>15</u> 11	<u>19</u> 10	<u>86</u> 47	<u>15</u> 70
	1+ - 2			
Общая длина (L), см	<u>12,97 ± 0,31</u> 12,38 ± 0,45	<u>15,47 ± 0,51</u> 12,83 ± 0,83	<u>15,02 ± 0,11*</u> 13,50 ± 0,11*	<u>17,32 ± 0,95</u> 16,66 ± 0,19*
Стандартная длина (S), см	<u>10,74 ± 0,26</u> 9,94 ± 0,37	<u>12,71 ± 0,44</u> 10,07 ± 0,38*	<u>12,40 ± 0,09</u> 10,83 ± 0,09*	<u>14,29 ± 0,68</u> 13,27 ± 0,15
Масса рыбы, г	<u>27,31 ± 1,47</u> 23,49 ± 2,97	<u>49,16 ± 4,46</u> 27,40 ± 6,19	<u>45,77 ± 0,92*</u> 34,27 ± 0,86*	<u>79,04 ± 10,85*</u> 64,78 ± 2,23*
Масса гонад, г	<u>3,07 ± 0,35</u> 1,99 ± 0,53	<u>1,29 ± 0,20</u> 0,85 ± 0,22	<u>4,52 ± 0,19*</u> 3,73 ± 0,21*	<u>1,12 ± 0,11</u> 0,75 ± 0,04
Масса печени, г	<u>0,83 ± 0,08</u> 1,09 ± 0,16	<u>1,85 ± 0,29</u> 0,90 ± 0,26	<u>1,51 ± 0,06*</u> 0,82 ± 0,06	<u>2,92 ± 0,42*</u> 1,94 ± 0,09*
ГСИ, %	<u>13,58 ± 1,54</u> 9,26 ± 1,70	<u>3,56 ± 0,80</u> 5,48 ± 1,93	<u>12,17 ± 0,51</u> 13,57 ± 0,77*	<u>2,07 ± 0,36</u> 1,34 ± 0,09*
ИП, ‰	<u>40,84 ± 4,65</u> 59,11 ± 10,6	<u>44,05 ± 7,26</u> 33,29 ± 2,68	<u>39,78 ± 1,65</u> 29,17 ± 1,89*	<u>42,69 ± 3,48</u> 33,45 ± 1,17
Упит., %	<u>1,84 ± 0,07</u> 1,86 ± 0,04	<u>2,15 ± 0,06</u> 1,90 ± 0,04	<u>1,99 ± 0,02*</u> <u>2,18 ± 0,03*</u>	<u>2,25 ± 0,09</u> <u>2,44 ± 0,03*</u>
Количество особей, n	<u>7</u> 22	<u>30</u> 59	<u>6</u> 17	<u>10</u> 57
	2+ - 3			
Общая длина (L), см	<u>14,18 ± 0,64</u> 12,54 ± 0,33	<u>17,80 ± 0,28</u> 15,74 ± 0,31	<u>15,43 ± 0,44</u> 13,96 ± 0,21*	<u>20,91 ± 0,48*</u> 17,59 ± 0,22*
Стандартная длина (S), см	<u>10,74 ± 0,26</u> 9,94 ± 0,37	<u>12,71 ± 0,44</u> 10,07 ± 0,38*	<u>12,40 ± 0,09</u> 10,83 ± 0,09*	<u>14,29 ± 0,68</u> 13,27 ± 0,15
Масса рыбы, г	<u>34,51 ± 3,15</u> 24,20 ± 2,01	<u>72,78 ± 3,14</u> 50,39 ± 3,10	<u>48,67 ± 3,98*</u> 40,71 ± 1,82*	<u>136,71 ± 7,67*</u> 81,49 ± 3,17*
Масса гонад, г	<u>3,56 ± 0,89</u> 1,65 ± 0,24	<u>1,24 ± 0,1</u> 0,70 ± 0,11	<u>4,92 ± 0,27</u> 4,09 ± 0,17*	<u>1,32 ± 0,12</u> 0,80 ± 0,05
Масса печени, г	<u>0,78 ± 0,10</u> 0,97 ± 0,09	<u>2,71 ± 0,23</u> 1,93 ± 0,15	<u>1,63 ± 0,31*</u> 1,33 ± 0,21	<u>5,76 ± 0,32*</u> 2,56 ± 0,17*
ГСИ, %	<u>11,83 ± 2,40</u> 8,75 ± 1,46	<u>1,84 ± 0,12</u> 1,89 ± 0,47	<u>12,67 ± 1,37</u> 12,97 ± 0,76*	<u>1,03 ± 0,06*</u> 1,17 ± 0,10

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5
ИП, ‰	$\frac{29,40 \pm 3,49}{49,44 \pm 4,38}$	$\frac{41,87 \pm 3,20}{41,51 \pm 1,95}$	$\frac{39,45 \pm 5,79}{38,86 \pm 4,42}$	$\frac{46,19 \pm 1,87}{34,30 \pm 1,50^*}$
Упит., ‰	$\frac{1,96 \pm 0,10}{1,82 \pm 0,05}$	$\frac{2,13 \pm 0,05}{1,95 \pm 0,07}$	$\frac{1,96 \pm 0,09}{2,40 \pm 0,07^*}$	$\frac{2,49 \pm 0,06^*}{2,56 \pm 0,04^*}$

Примечания: **жирным шрифтом** обозначены достоверность различий ($p \leq 0,05-0,001$) между рыбами, отловленными в 2003 г. и 2009-2012 гг.; * - достоверность различий между самками и самцами бычка-кругляка из двух морей

Долговременные изменения размерно-массовых и морфофизиологических характеристик бычка-кругляка из бухт с разным уровнем загрязнения в Черном и Азовском морях представлены в таблицах 2.2 и 2.3 соответственно.

Таблица 2.2 Размерно-массовые и морфофизиологические характеристики самок и самцов бычка-кругляка из акваторий Севастополя с разным уровнем загрязнения в 2003 г. и 2009-2012 гг.

Параметры	б. Стрелецкая		б. Мартынова		б. Карантинная	
	2003 г. 2009-2012 гг.					
	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы
1	2	3	4	5	6	7
Количество особей, n	$\frac{4}{-}$	$\frac{6}{-}$	$\frac{4}{3}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{6}{5}$	$\frac{10}{6}$
Возраст, год	1+ - 2					
Общая длина, см	$\frac{14,10 \pm 0,84}{-}$	$\frac{15,13 \pm 0,67}{-}$	$\frac{13,17 \pm 0,15}{12,5 \pm 0,83}$	$\frac{16,00 \pm 1,39}{13,32 \pm 2,19}$	$\frac{12,30 \pm 0,27^{\bullet}}{12,32 \pm 0,73}$	$\frac{15,28 \pm 0,75}{12,82 \pm 0,92}$
Масса рыбы, г	$\frac{32,67 \pm 3,88}{-}$	$\frac{47,50 \pm 6,07}{-}$	$\frac{26,36 \pm 2,18}{22,75 \pm 4,48}$	$\frac{46,51 \pm 12,10}{34,03 \pm 18,12}$	$\frac{24,40 \pm 1,22}{25,28 \pm 5,45}$	$\frac{47,61 \pm 5,57}{25,67 \pm 5,70}$
Масса гонад, г	$\frac{2,88 \pm 0,75}{-}$	$\frac{0,98 \pm 0,15}{-}$	$\frac{3,68 \pm 0,51}{1,22 \pm 0,98}$	$\frac{1,16 \pm 0,66}{1,07 \pm 0,37}$	$\frac{2,68 \pm 0,66}{2,67 \pm 0,81}$	$\frac{1,64 \pm 0,33}{0,60 \pm 0,24}$
Масса печени, г	$\frac{1,47}{-}$	$\frac{1,69 \pm 0,33}{-}$	$\frac{0,54 \pm 0,04}{0,84 \pm 0,18}$	$\frac{1,04 \pm 0,42}{0,87 \pm 0,48}$	$\frac{0,89 \pm 0,10}{1,35 \pm 0,27}$	$\frac{2,36 \pm 0,28^{\bullet}}{0,86 \pm 0,26}$
ГСИ, %	$\frac{9,45 \pm 2,21}{-}$	$\frac{2,54 \pm 0,68}{-}$	$\frac{17,16 \pm 1,42^*}{5,23 \pm 3,68}$	$\frac{1,64 \pm 0,54}{8,34 \pm 4,39}$	$\frac{13,48 \pm 3,09}{12,95 \pm 1,72}$	$\frac{4,76 \pm 1,29^{\bullet}}{4,08 \pm 2,05}$
ИП, ‰	$\frac{67,24}{-}$	$\frac{43,28 \pm 4,68}{-}$	$\frac{25,82 \pm 2,03}{47,39 \pm 13,42}$	$\frac{17,74 \pm 1,91^*}{27,58 \pm 2,43}$	$\frac{46,48 \pm 5,82^{\bullet}}{57,52 \pm 13,97}$	$\frac{51,79 \pm 10,32^{\bullet}}{34,89 \pm 3,50}$
Упит., %	$\frac{1,95 \pm 0,23}{-}$	$\frac{2,25 \pm 0,11}{-}$	$\frac{1,68 \pm 0,09}{1,96 \pm 0,05}$	$\frac{1,99 \pm 0,07}{1,95 \pm 0,05}$	$\frac{1,85 \pm 0,08}{1,83 \pm 0,08}$	$\frac{2,14 \pm 0,10}{1,88 \pm 0,06}$

Продолжение таблицы 2.2

1	2	3	4	5	6	7
Количество особей, n	$\frac{3}{8}$	$\frac{5}{11}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{4}{8}$	$\frac{-}{13}$	$\frac{21}{31}$
Возраст, год	2+ - 3					
Общая длина, см	$\frac{14,03 \pm 0,27}{12,70 \pm 0,63}$	$\frac{17,00 \pm 0,37}{16,00 \pm 0,69}$	$\frac{15,47 \pm 0,24^*}{13,9}$	$\frac{19,17 \pm 0,48^*}{16,02 \pm 1,25}$	$\frac{-}{12,36 \pm 0,32}$	$\frac{17,73 \pm 0,35^*}{15,56 \pm 0,40}$
Масса рыбы, г	$\frac{32,18 \pm 0,45}{24,71 \pm 3,65}$	$\frac{66,13 \pm 1,81}{53,00 \pm 6,05}$	$\frac{41,05 \pm 4,36}{37,04}$	$\frac{79,01 \pm 6,99}{55,22 \pm 12,88}$	$\frac{-}{32,21 \pm 2,29}$	$\frac{73,17 \pm 4,23}{47,89 \pm 3,89}$
Масса гонад, г	$\frac{3,22 \pm 0,87}{1,62 \pm 0,31}$	$\frac{1,28 \pm 0,08}{0,60 \pm 0,13}$	$\frac{4,41 \pm 2,01}{-}$	$\frac{0,70 \pm 0,7}{1,46 \pm 0,39^*}$	$\frac{-}{1,64 \pm 0,30}$	$\frac{1,20 \pm 0,14}{0,57 \pm 0,11^*}$
Масса печени, г	$\frac{1,08}{0,92 \pm 0,18}$	$\frac{2,84 \pm 0,36}{1,96 \pm 0,36}$	$\frac{0,69 \pm 0,04}{1,31}$	$\frac{1,70 \pm 0,31^*}{1,97 \pm 0,60}$	$\frac{-}{1,02 \pm 0,11}$	$\frac{2,97 \pm 0,33^*}{1,95 \pm 0,16}$
ГСИ, %	$\frac{11,64 \pm 3,61}{8,62 \pm 2,86}$	$\frac{2,09 \pm 0,18}{1,85 \pm 0,82}$	$\frac{12,56 \pm 5,20}{-}$	$\frac{1,94 \pm 0,45}{5,22 \pm 2,10}$	$\frac{-}{8,64 \pm 1,64}$	$\frac{1,76 \pm 0,15}{1,06 \pm 0,15}$
ИП, ‰	$\frac{41,33}{48,79 \pm 8,39}$	$\frac{46,42 \pm 6,20}{38,76 \pm 4,88}$	$\frac{22,09 \pm 0,16}{40,07}$	$\frac{23,23 \pm 2,13}{38,56 \pm 5,10}$	$\frac{-}{53,12 \pm 5,17}$	$\frac{45,81 \pm 2,96}{44,44 \pm 2,54}$
Упит., %	$\frac{1,89 \pm 0,10}{1,75 \pm 0,07}$	$\frac{2,36 \pm 0,11}{2,05 \pm 0,05}$	$\frac{1,74 \pm 0,16}{2,34}$	$\frac{1,87 \pm 0,05^*}{1,92 \pm 0,03^*}$	$\frac{-}{1,82 \pm 0,05}$	$\frac{2,13 \pm 0,07^*}{1,95 \pm 0,03}$

Примечания: **жирным шрифтом** обозначены достоверность различий ($p \leq 0,05-0,001$) между рыбами, отловленными в 2003 г. и 2009-2012 гг.; * - достоверность различий между самками и самцами бычка-кругляка из Стрелецкой бухты и других районов в соответствующий период времени; • – между самками и самцами бычка-кругляка из бухты Мартынова и других районов в соответствующий период времени

Таблица 2.3 Размерно-массовые и морфофизиологические характеристики самок и самцов бычка-кругляка из двух районов юго-западной части Азовского моря с разным уровнем загрязнения в 2003 г. и 2011-2012 гг.

Параметры	с. Семеновка		с. Мысовое	
	2003 г. 2011-2012 гг.			
	самки	самцы	самки	самцы
1	2	3	4	5
Количество особей, n	$\frac{57}{31}$	$\frac{7}{20}$	$\frac{29}{17}$	$\frac{8}{47}$
Возраст, год	1+ - 2			
Общая длина, см	$\frac{14,92 \pm 0,13}{13,65 \pm 0,12}$	$\frac{19,35 \pm 0,79}{17,56 \pm 0,29}$	$\frac{15,23 \pm 0,20}{13,29 \pm 0,21}$	$\frac{15,15 \pm 1,41^*}{16,37 \pm 0,20^*}$

Продолжение таблицы 2.3

1	2	3	4	5
Масса рыбы, г	<u>45,50±1,03</u> 35,24±0,94	<u>106,83±9,33</u> 73,54±4,96	<u>46,28±1,83</u> 32,60±1,62	54,71±13,97* 61,05±2,26*
Масса гонад, г	<u>4,69 ± 0,24</u> 4,50±0,19	<u>1,12±0,18</u> 0,95±0,09	<u>4,18 ± 0,29</u> 2,14±0,23*	<u>1,12 ± 0,13</u> 0,64±0,04*
Масса печени, г	<u>1,48±0,08</u> 0,64±0,04	<u>4,15 ± 0,38</u> 1,98±0,16	<u>1,57 ± 0,12</u> 1,16±0,13*	<u>1,85 ± 0,45*</u> 1,96±0,11
ГСИ, %	<u>12,82±0,67</u> <u>16,27±0,71</u>	<u>1,11 ± 0,13</u> 1,58±0,25	<u>10,89±0,71</u> 8,00±0,81*	<u>2,92 ± 0,51*</u> 1,19±0,07
ИП, ‰	<u>39,36±2,03</u> 22,50±1,37	<u>42,73±2,20</u> 30,12±1,72	<u>40,59±2,81</u> 41,28±2,81*	<u>52,66±6,46</u> 33,50±1,50
Упит., %	<u>2,02 ± 0,02</u> <u>2,12±0,04</u>	<u>2,41 ± 0,14</u> 2,52±0,07	<u>1,94 ± 0,02*</u> <u>2,27±0,06*</u>	<u>2,11±0,08</u> <u>2,44±0,03</u>
Количество особей, n	<u>3</u> 15	<u>4</u> 33	<u>3</u> 3	<u>6</u> 27
Возраст, год	2+ - 3			
Общая длина, см	<u>14,66±0,17</u> 13,74±0,18	<u>21,90±0,67</u> 17,47±0,30	<u>16,20±0,61</u> 15,01±0,51*	<u>20,25±0,55</u> 17,73±0,29
Масса рыбы, г	<u>42,66±1,70</u> 38,06±1,10	<u>145,80±7,19</u> 78,05±3,82	<u>54,66±6,35</u> 51,05±7,13	<u>130,65±11,72</u> 84,30±4,86
Масса гонад, г	<u>5,21±0,27</u> 4,06±0,26	<u>1,57±0,20</u> 0,86±0,04	<u>4,64±0,46</u> 3,14±0,61	<u>1,15±0,18</u> 0,69±0,09
Масса печени, г	<u>1,12±0,22</u> 1,05±0,12	<u>6,33±0,6</u> 1,99±0,12	<u>2,14±0,42</u> 2,60±0,78	<u>5,39±0,52</u> 3,26±0,29*
ГСИ, %	<u>15,19±1,48</u> 13,41±0,88	<u>1,15±0,09</u> 1,37±0,14	<u>10,14±0,87*</u> 7,28±0,8*	<u>0,96±0,11</u> 0,86±0,09*
ИП, ‰	<u>31,98±5,75</u> 34,52±3,85	<u>46,37±1,83</u> 29,30±1,42	<u>46,91±8,86</u> 57,63±12,5	<u>46,06±3,8</u> 41,26±2,21*
Упит., %	<u>2,01±0,17</u> <u>2,40±0,07</u>	<u>2,38±0,09</u> 2,54±0,06	<u>1,90±0,08</u> <u>2,37±0,13</u>	<u>2,56±0,09</u> 2,56±0,04

Примечания: **жирным шрифтом** обозначены достоверность различий ($p \leq 0,05-0,001$) между рыбами, отловленными в 2003 г. и 2009-2012 гг.; * - достоверность различий между самками и самцами бычка-кругляка из двух районов в соответствующий период времени

Установлено, что бычок-кругляк из Арабатского залива Азовского моря превосходит рыб из побережья Севастополя по длине и массе тела, массе гонад и печени, по величине ГСИ (у самок) и упитанности в оба исследуемые периода.

В то же время установлено снижение размерно-массовых и морфофизиологических характеристик бычка-кругляка из двух морей в 2009-2012 гг. по сравнению с соответствующими значениями рыб в 2003 г.

Существуют различия и между бычками данного вида, живущими в разных участках моря, различающихся по степени антропогенной нагрузки и кормовым ресурсам. Бычок-кругляк, живущий в Азовском море в районе с. Семеновка, отличается от кругляка из района с. Мысовое более высокими средними величинами длины и массы тела, массы гонад и ГСИ, что говорит о более благоприятных для нагула и размножения условиях в первом районе исследования. У черноморских бычков эти различия выражены в меньшей степени, что обусловлено малой выборкой исследуемого объекта.

2.2 Ихтиологические методы

В ходе биологического анализа определяли размер рыб (общая длина, стандартная длина), массу рыбы и массу рыбы без внутренностей (масса тушки), массу печени, гонад, пол, стадию зрелости. Возраст рыб определяли по отолитам. Индексы органов рассчитывали по Правдину (1996) [95].

Индекс печени (ИП) (‰) вычисляли по формуле (1):

$$\text{ИП} = \frac{Р_{\text{п}} \cdot 1000}{Р_{\text{т}}}, \quad (1)$$

где $Р_{\text{п}}$ – масса печени; $Р_{\text{т}}$ – масса тушки.

Гонадосоматический индекс (ГСИ) (%) рассчитывали по формуле (2):

$$\text{ГСИ} = \frac{Р_{\text{г}} \cdot 100}{Р_{\text{т}}}, \quad (2)$$

где $Р_{\text{г}}$ – масса гонад; $Р_{\text{т}}$ – масса тушки.

Упитанность (Упит.) (%) рассчитывали по формуле (3):

$$U_{\text{пит.}} = \frac{P_{\text{т}} \cdot 100,}{SL^3} \quad (3)$$

где $P_{\text{т}}$ – масса тушки; SL – стандартная длина.

2.3 Физико-химические методы исследования тканевых экстрактов

Материалом исследования служила кровь бычка-кругляка, отобранная из хвостовой артерии. Сыворотку отделяли методом отстаивания и центрифугирования на холоду в течение 15 минут при 3000 об./мин. Гемолизаты эритроцитов получали путем трехкратного промывания суспензии эритроцитов 0,85%-ным раствором хлорида натрия и последующего гемолиза дистиллированной водой в соотношении эритроциты : вода – 1 : 5 [138].

2.3.1 Определение уровня окислительной модификации сывороточных белков крови

Определение степени окисления сывороточных белков проводилось по методу Дубининой Е.Е. [36], предложенному для использования в клинической лабораторной диагностике для человека, в связи с чем в работе с сывороткой крови рыб методика была модифицирована. Для анализа использовали 0,05 мл сыворотки крови, 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, 1 мл 2,4-динитрофенилгидразона (2,4-ДФГ), растворенного в HCl (2 М) (опытная проба), контрольная проба включала 1 мл HCl (2 М). После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре пробы центрифугировали (3000 g) 15-20 минут. Осадок промывали раствором этанол-этилацетат (1:1) и снова центрифугировали. К подсушенному осадку приливали 2,5 мл 8 М мочевины и ставили на кипящую водяную баню до полного его растворения. Оптическую плотность прореагировавших с окисленными карбонильными группами 2,4-динитрофенилгидразонов определяли при следующих длинах волн: 346, 370, 430, 530 на спектрофотометре Specol-211 (фирма Carl Zeiss, Jena, Германия).

2.3.2 Определение активности антиоксидантных ферментов

Анализ ферментативной активности осуществляли на спектрофотометре Specol-211 (фирма Carl Zeiss, Iena, Германия) при комнатной температуре учитывая тот факт, что исследовали пойкилотермных организмов в физиологически адекватных условиях [143].

Активность *каталазы* определяли по разложению перекиси водорода [11]. Реакционная смесь содержала 3,5 мл дистиллированной воды; 0,5 мл пробы; 1 мл 1 %-ной перекиси водорода. Через 30 минут реакцию останавливали 2,5 мл 10 %-ого раствора концентрированной серной кислоты. Титрование проводили 1 н раствором перманганата калия (KMnO_4). Активность фермента рассчитывали по формуле (4):

$$A = \frac{1,7 \cdot (V_{\text{конт}} - V_{\text{оп}})}{V \cdot t \cdot c}, \quad (4)$$

где $V_{\text{конт}}$ и $V_{\text{оп}}$ – объемы KMnO_4 , использованные на титрование контрольной и опытной проб соответственно, мл; 1,7 – каталазное число; V – объем пробы, мл; c – концентрация Hb , мг/мл.; t – время, мин.; A – активность фермента, мг H_2O_2 /мг Hb в мин.

Активность *супероксиддисмутаза* определяли по степени снижения скорости процессов восстановления нитросинего тетразоля в инкубационной среде [260], используя реакционную смесь: 0,6 мл 0,5 М фосфатного буфера pH 7,8; 0,75 мл 0,0136%-ного раствора НАДН; 0,35 мл 0,00038%-ного раствора нитросинего тетразоля и 0,1 мл пробы. Реакцию проводили в кювете спектрофотометра путем добавления 0,1 мл 0,000613%-ного раствора феназинметасульфата при длине волны 560 нм в течение 1 минуты. Активность фермента рассчитывали по формуле (5):

$$A = \frac{\Delta E_{\text{хол}} - \Delta E_{\text{оп}}}{V \cdot c \cdot \Delta E_{\text{хол}}} \cdot 100 \%, \quad (5)$$

где $\Delta E_{хол}$ – разница между конечным и начальным значениями экстинкции холостой пробы; $\Delta E_{оп}$ – разница между конечным и начальным значениями экстинкции опытной пробы; V – объем пробы, мл; c – концентрация Нб, мг/мл; A – активность фермента, условные единицы (усл. ед.)/мг Нб в мин.

Активность *пероксидазы* определяли бензидиновым методом [64]. Состав реакционной смеси: 0,6 мл ацетатного буфера pH 5,4; 0,4 мл бензидинового реактива; 0,1 мл пробы; 0,2 мл 0,03%-ной перекиси водорода. Измерения проводили при длине волны 600 нм в течение 1 минуты. Активность фермента вычисляли по формуле (6):

$$A = \frac{E_k - E_n}{V \cdot c}, \quad (6)$$

где E_n – начальное значение экстинкции; E_k – конечное значение экстинкции; V – объем пробы, мл; c – концентрация Нб, мг/мл; A – активность фермента, оптические единицы (опт. ед.) / мг Нб в мин.

Активность *глутатионредуктазы* определяли по убыли концентрации НАДФН [93] в реакционной среде: 1мл фосфатного буфера 0,5 М, pH 8,0; 0,1 мл 1 М ЭДТА; 0,25 мл 7,5 мМ окисленного глутатиона, 0,05 мл 1,2 мМ НАДФН; 0,1 мл пробы. Измерения проводили при длине волны 340 нм в течение 10 минут. Активность фермента рассчитывали по формуле (7):

$$A = \frac{1000 \cdot (E_n - E_k) \cdot 1,5}{6,22 \cdot V \cdot t \cdot c}, \quad (7)$$

где E_n и E_k – начальные и конечные значения экстинкции; 1000 –коэффициент перевода мкмоль в нмоли; 1,5 – общий объем смеси, мл; V – объем пробы, мл.; c – концентрация Нб, мг/мл; 6,22 – молярный коэффициент поглощения НАДФН; t – время, мин.; A – активность фермента, нмоль НАДФН/мг Нб в мин.

Активность *глутатион-S-трансферазы* определяли по накоплению конъюгата [93] в реакционной среде: 1,5 мл фосфатного буфера 0,1 М, pH 6,5; 0,2

мл глутатиона восстановленного; 0,02 мл 0,1 М 1-хлор-2,4-динитробензола; 0,1 мл пробы. Измерения проводили при длине волны 340 нм в течение 3 минут. Активность фермента рассчитывали по формуле (8):

$$A = \frac{1000 \cdot (\Delta E_{\text{оп}} - \Delta E_{\text{к}}) \cdot 1,82}{9,6 \cdot V \cdot t \cdot c} \quad (8)$$

где $\Delta E_{\text{оп}}$ – разница между начальным и конечным значениями экстинкции опыта; $\Delta E_{\text{к}}$ – разница между начальным и конечным значениями экстинкции контроля; 1000 – пересчетный коэффициент; 1,82 – общий объем смеси, мл; V – объем пробы, мл; c – концентрация Нб, мг/мл; 9,6 – молярный коэффициент накопления конъюганта; t – время, мин.; A – активность фермента, нмоль конъюгата/мг Нб в мин.

2.3.3 Определение концентрации альбумина в сыворотке крови

Концентрацию сывороточного альбумина (г/л) определяли спектрофотометрическими методами (630 нм) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Филисит - Диагностика» (Украина). Принцип метода основан на способности альбумина в слабокислой среде и присутствии детергента образовывать окрашенное соединение с бромкрезоловым зеленым, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации альбумина в сыворотке крови. Для этого в опытную, калибровочную и холостую пробы наливали 2,0 мл рабочего раствора и 0,02 мл сыворотки крови в опытную пробу, 0,02 мл стандартного раствора альбумина (50 ± 2) г/л в калибровочную пробу, в холостую – 0,02 мл физиологического раствора. Полученные растворы инкубировали 25 мин, после чего измеряли оптическую пробу калибровочной ($E_{\text{кал}}$) и опытной ($E_{\text{опыт}}$) проб против холостой пробы. Расчет концентрации альбумина проводили по формуле (9):

$$C = \frac{E_{\text{опыт}}}{E_{\text{кал}}} \cdot 100 \%, \quad (9)$$

где C – концентрация альбумина в опытной пробе, г/л; 50 – концентрация альбумина в калибровочном растворе, г/л; $E_{\text{опыт}}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотности; $E_{\text{кал}}$ – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотности.

2.3.4 Определение белкового состава сыворотки крови методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле

Определение белкового состава сыворотки крови рыб проводили методом диск-электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле [194] в приборе конструкции фирмы «Reanal» (Венгрия), электродный буфер трис-глициновый pH 8,3.

В соответствии с прописью готовили мелкопористый гель (разделяющий) и вносили по 2 мл в каждую трубочку, сверху наслаивали воду, после полимеризации наносили по 0,2 мл крупнопористого концентрирующего геля и опять наслаивали воду. Об окончании полимеризации судили по появлению опалового цвета геля. В каждую трубочку наносили по 0,1 мл образца из расчета 250 мкг белка (разведение 40%-ной сахарозы) [194].

Первые 30 минут электрофорез проводили при силе тока 2 мА на трубочку, с последующим увеличением до 3-4 мА. О времени окончания электрофореза судили по положению диска красителя (0,001%-ный водный раствор бромфенолового синего), добавленного непосредственно в катодный электролит. Окрашивание белковых фракций на диск-электрофореграммах осуществляли 1%-ным раствором амидошварца 10-В в 7%-ной уксусной кислоте в течение 30 минут. Несвязанный белками краситель удаляли многократным промыванием гелей в 7%-ной уксусной кислоте. Электрофоретическую подвижность белковых фракций рассчитывали по отношению к подвижности свидетеля.

Распределение белковых фракций учитывали по коэффициенту относительной электрофоретической подвижности ($K_{\text{эф}}$), рассчитанному по отношению расстояния от старта до центра белковой полосы к расстоянию,

пройденному в геле свидетелем. На основании Кэф были определены стандартные электрофоретические спектры белков (ЭФ-спектры). Для этого был применен способ установления вероятности положения каждой электрофоретической фракции на основании среднестатистических выборок частоты появления полос. Фракции учитывали при появлении полосы с данным Кэф не менее чем в 50% случаев [135]. Белковые фракции группировали в белковые зоны: преальбуминовую, альбуминовую, постальбуминовую, трансфериновую, посттрансфериновую, предстартовую. При этом за основу были приняты данные по идентификации сывороточных белков бычка-кругляка, полученные Рудневой И.И. [106].

2.4 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили по [61]. Вычисляли среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (σ), ошибку среднего арифметического (m). Сравнительный анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми рядами считали достоверными и статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

С целью выявления зависимости между исследуемыми параметрами рассчитывали коэффициент корреляции (r) с помощью стандартной программы “EXCEL”. При этом считали, что при коэффициентах корреляций $0 < r < 0,3$ имеет место слабая связь, $0,3 < r < 0,5$ – умеренная, $0,5 < r < 0,7$ – значительная, $0,7 < r < 0,9$ – сильная [61].

Все исследования проводили на оборудовании, прошедшем метрологическую проверку.

2.5 Экологическая характеристика среды обитания рыб

В последнее время экологическим проблемам Азово-Черноморского бассейна уделяется особое внимание в связи с продолжающимся значительным

антропогенным воздействием. Масштабы загрязнения становятся угрожающими для экосистемы и приводят к крайне негативным последствиям. Так, в странах Азово-Черноморского бассейна функционируют 14 видов производств черной и 10 видов отраслей цветной металлургии, в отходах которых содержатся значительные количества Cr, Pb, Zn, As, Mn, Cu, масла и фенолов [279]. На прибрежной акватории расположено около 20 морских портов и 10 судостроительных и судоремонтных заводов [32]. Более 1500 предприятий сбрасывают в бассейн Азовского моря 28 млн м³ сточных вод в сутки, третья часть из которых - без всякой очистки. С водами Дона, Кубани и со стоками приморских городов в начале 80-х годов в море ежегодно поступало свыше 15 000 т нефтепродуктов, 2 000 т детергентов, 250 т фенолов [2].

На сельскохозяйственных площадях Азовского бассейна используется около 150 наименований ядохимикатов, концентрация которых в отдельных районах моря превышает рыбохозяйственные ПДК в десятки тысяч раз [2]. Все это негативно влияет на биоту этих водоемов и делает необходимым изучение спектра загрязняющих веществ в районах лова рыб для оценки их влияния на физиолого-биохимический статус организма.

Экологическая характеристика прибрежной зоны Черного моря в районе г. Севастополя

Севастополь – типичный портовый город с развитой промышленной и коммунальной инфраструктурой, негативно влияющей на прибрежные акватории [52; 133]. Основными загрязнителями Севастопольских бухт являются хозяйственно-бытовые сточные воды, отходы флота и ливневые стоки. В море сточные воды разбавляются, однако это разбавление может быть недостаточным, что приводит к превышению допустимых уровней многих гидрохимических и микробиологических показателей морской воды.

Значительное влияние на экологическое состояние севастопольских бухт и прибрежных вод оказывают сбросы отходов промышленными и

сельскохозяйственными предприятиями, береговыми войсковыми частями, судами Министерства обороны Российской Федерации, базирующимися в г. Севастополе.

В прибрежные воды города ежегодно сбрасывается около 60 млн. куб. м. сточных вод, в том числе прошедших только механическую очистку 44 млн. куб. м (73%), без очистки – более 14%, биологически очищенных – около 8 млн. куб. м, то есть 13% от общего количества [52].

Исследования проводили на рыбах из трех севастопольских бухт (Стрелецкая, Мартынова и Карантинная) с разным уровнем загрязнения (Рисунок 2.2, Таблица 2.4).

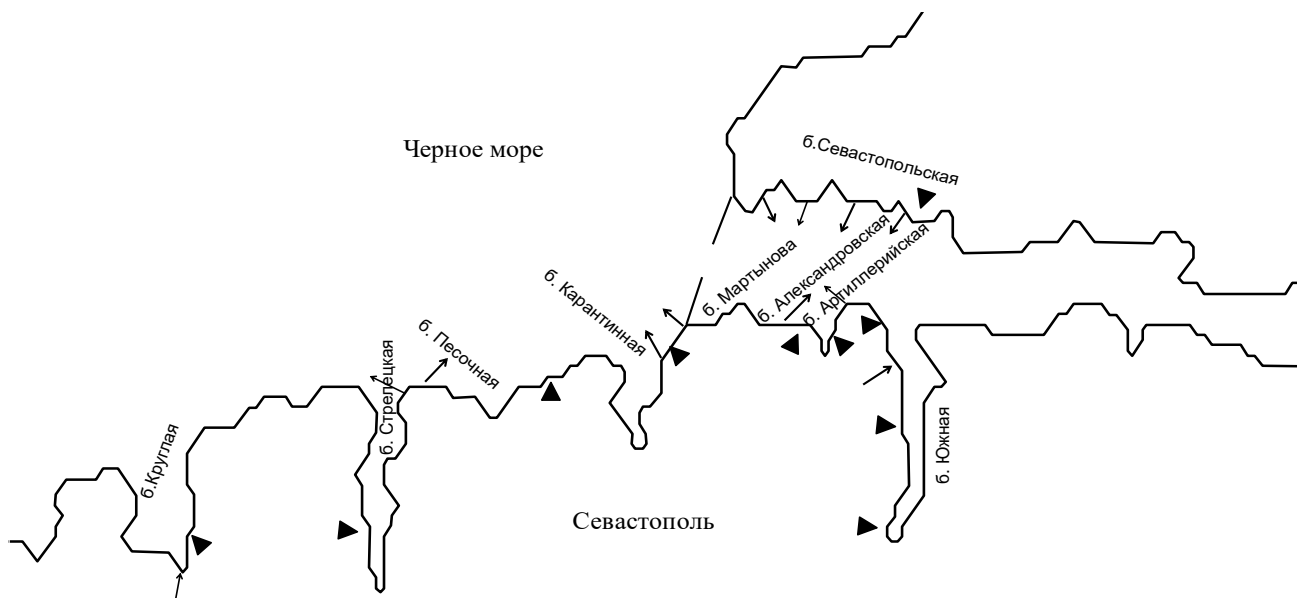


Рисунок 2.2 Расположение бухт Севастополя и их загрязнение сточными водами (стрелками обозначены выпуски хозяйственно-бытовых, треугольниками – ливневых вод) [54]

В Стрелецкой бухте в наибольшей степени развито судоходство и рекреация, наряду с выпусками с кораблей, нефтепродуктами и ржавыми металлическими конструкциями, в значительной степени загрязняющими морскую среду. Количество сточных вод, попадающих в эту акваторию из городского коллектора, превышает соответствующие значения в Карантинной бухте [17; 54].

Доминирующими загрязнителями исследуемых бухт являются нефтепродукты, тяжелые металлы, хлорсодержащие углеводороды, пестициды, детергенты, фенолы, биогены и взвешенные вещества, концентрация которых может в отдельных случаях превышать предельно-допустимые уровни [54; 127].

Во всех исследуемых бухтах содержание взвешенных веществ в воде выше значений ПДК. Уровень основных загрязнителей в Стрелецкой бухте превышает соответствующие значения в бухтах Мартынова и Карантинной (Таблица 2.4).

Таблица 2.4 Гидрохимические и токсикологические показатели воды севастопольских бухт (по данным Инспекции по охране Черного и Азовского морей, ГП «Крымский региональный научно-производственный центр стандартизации, метрологии и сертификации», г. Симферополь)

Показатели, мг/л	Бухта			ПДК, мг/л
	Стрелецкая	Мартынова	Карантинная	
НУ	0,15-0,08	0,03-0,01	0,07-0,05	—
СПАВ	0,009	0,002	0,003	0,1
БПК ₅	2,9	2,1	2,5	2
Взвешенное вещество	3,4	1,9	2,4	1,75
NH ₄ ⁺	0,02	0,03	0,02	0,5
NO ₃ ⁻	0,004	0,003	0,003	—
Fe	0,07	0,02	0,03	0,05
Cu	0,028	—	0,006	0,005
Pb	0,04	—	0,02	0,01
Cd	—	—	—	0,01
Zn	0,72	—	0,17	0,05
As	0,07	—	0,018	0,01
Hg	0,027	—	0,0038	0,0001

Примечания: НУ - нефтеуглеводороды

В бухте Мартынова нет прямых источников загрязнения, однако выпуски ливневых стоков из городского коллектора осуществляются в соседние с ней Карантинную и Севастопольскую бухты, в результате чего ксенобиотики попадают и в ее акваторию (Рисунок 2.2). Содержание взвешенных веществ в ней выше ПДК. В Карантинную бухту осуществляется сброс хозяйственно-бытовых (2 источника) и ливневых сточных вод (1 источник), что приводит к увеличению ПДК по содержанию взвешенных веществ (Таблица 2.4). Концентрация тяжелых металлов в воде бухты Мартынова находится в пределах нормативных значений. Обнаружено превышение ПДК меди, свинца, цинка, мышьяка и ртути в акваториях Карантинной бухты. В Стрелецкой бухте установлено значительное превышение ПДК всех исследованных металлов (за исключением кадмия) (Таблица 2.4).

По данным отдела санитарной гидробиологии ИМБИ (Севастополь) наиболее загрязненными являются грунты бухты Стрелецкой [46] (Таблица 2.5).

Таблица 2.5 Химические и микробиологические показатели грунтов исследованных бухт [46]

Показатели	Бухта		
	Стрелецкая	Мартынова	Карантинная
1	2	3	4
НУ	705	104	65
Суммарные углеводороды	973	250	119
Хлороформный битумоид	1282	264	165
Углеводоподобные соединения	1502,3	460,3	378,3
Белковоподобные соединения	905,7	237	73,6
Липидоподобные соединения	509,5	190,8	115,1
Природные углеводороды	268	146	54
Натуральная влажность	69,07	43,46	38,34
pH	7,71	7,26	7,86
Eh, мВ	– 88	– 21	+ 106
rH ₂	13	13	19

Продолжение таблицы 2.5

1	2	3	4
Гетеротрофные бактерии	17000	197000	80000
Нефтеокисляющие бактерии	1374	408	122

Примечания: НУ – нефтеуглеводороды; Eh – редокс-потенциал; $\lg H_2$ – отрицательный логарифм количества газообразного водорода

Загрязнение патогенными микроорганизмами отмечено для всех бухт по показателям «БГКП» и «МАФАМ» (Таблица 2.6). В Карантинной бухте значение БГКП выше такового в бухте Мартыновой более чем в 30 раз и больше нормы в 14 раз.

По показателю «микробное число» (МАФАМ) бухта Мартынова загрязнена сильнее, чем Карантинная. Свежие фекальные загрязнения в воде исследованных районов не установлены.

Таблица 2.6 Уровень микробиологического загрязнения воды исследованных бухт [88]

Бухта	БГКП КІ	Свежие фекальные загрязнения	МАФАМ
Мартынова	2300	-	500
Карантинная	70000	-	375
ПДК	менее 3	не допускается	100

Примечания: «+»- выявлены, «-»- не выявлены, БГКП – бактерии группы кишечной палочки, МАФАМ – мезофильные аэробные и факультативные анаэробные бактерии

Таким образом, на основании представленных данных о загрязнении морской воды и грунтов исследуемых районов можно сделать вывод, что бухта Стрелецкая наиболее загрязнена по сравнению с бухтами Мартынова и Карантинной. Что касается двух последних, то нельзя однозначно судить о том,

какая из них является более загрязненной. Согласно данным, приведенным в таблицах 2.4 и 2.5, можно сказать, что грунты бухты Мартынова загрязнены в большей степени, чем Карантинной, тогда как поверхностные слои воды, наоборот, являются более загрязненными в последней, что обусловлено различным расположением данных бухт и наличием в Карантинной бухте выпусков хозяйственно-бытовых сточных вод. Этот факт необходимо учитывать при изучении влияния комплексного загрязнения на состояние исследуемых параметров в крови прибрежных рыб, относящихся к разным экологическим группам.

Экологическая характеристика прибрежной зоны юго-западной части Азовского моря (с. Семеновка, с. Мысовое)

Юго-западная часть Азовского моря (Арабатский залив) ранее считалась относительно чистой и экологически благополучной зоной. В настоящее время ситуация несколько изменилась. Основными источниками загрязнения этой части Азовского моря являются, начиная с 2000 г., разработка и эксплуатация шельфовых месторождений газа, донный траловый промысел пиленгаса, а также сельскохозяйственная деятельность [94]. В первых двух случаях происходит поднятие грунтов, что приводит к внесению дополнительных загрязняющих веществ, не характерных для современных донных осадков. Кроме того, освоение газовых месторождений неизбежно связано с образованием значительных объемов токсичных отходов, среди которых наиболее опасными являются буровые растворы. В их составе есть органические и неорганические вещества, ПАВ, пеногасители, смазочные добавки, биоциды и тяжелые металлы. Последние в качестве примесей присутствуют в барите и составляют: Pb – до 0,22%, Cd – до 0,124% и Cu – до 0,019% [115]. Все этапы данного промышленного процесса приводят к множественным негативным последствиям для окружающей среды, включая истощение кормовой базы и ценных биоресурсов [82].

Районы отлова рыб представлены на рисунке 2.3 и различаются по своим экологическим характеристикам.

С. Семеновка находится у мыса Китень. Основными источниками загрязнения прибрежных вод в районе с. Семеновка являются сельхозугодья (зерновые культуры, подсолнечник, рапс) и нефтедобыча.

С. Мысовое расположено у мыса Казантип, который является северо-восточной оконечностью полуострова, разделяющего Казантипский и Арабатский заливы. Среди основных источников загрязнения этого района выделяют Восточно-казантипскую газовую буровую и нефтедобычу на м. Казантип.

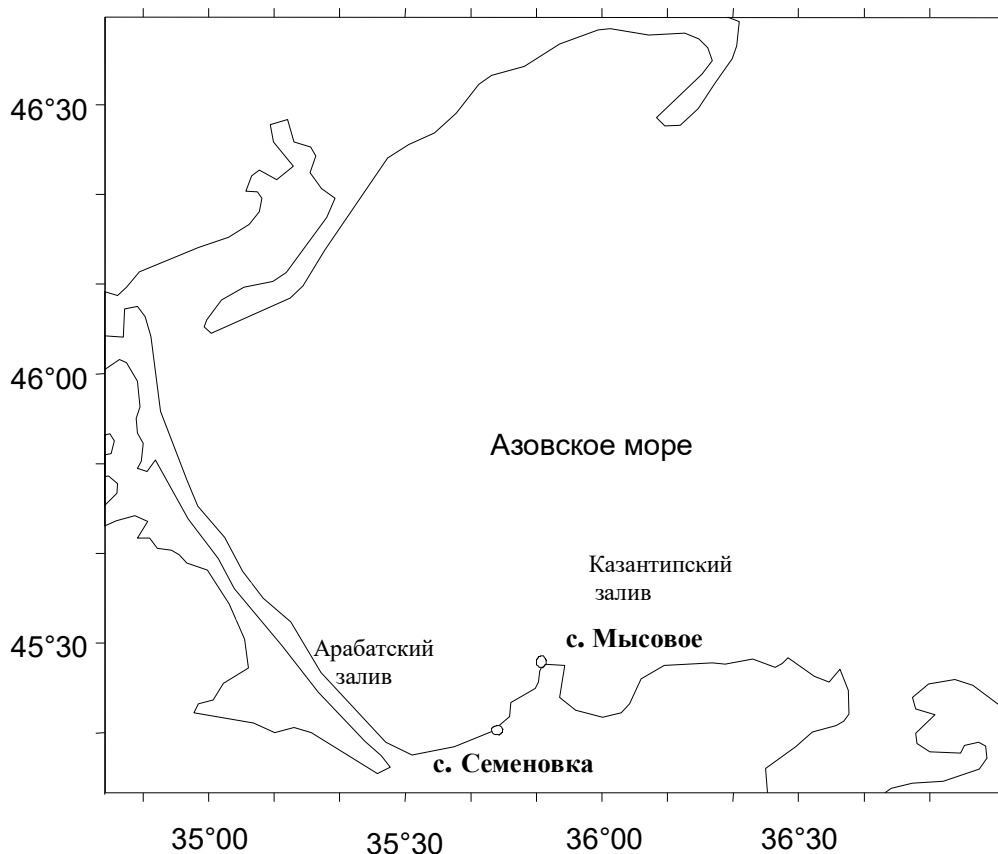


Рисунок 2.3 Расположение районов отбора проб в Арабатском заливе Азовского моря (с. Семеновка, с. Мысовое)

Согласно данным, представленным в таблице 2.7, концентрация биогенных элементов выше, а БПК₅ ниже в морской воде у с. Семеновка.

Таблица 2.7 Гидрохимические параметры морской воды в юго-западной части Азовского моря (февраль – август 2005 г.) [155]

Параметр	с. Семеновка		с. Мысовое	
	Среднее значение, М	min - max	Среднее значение, М	min - max
S, ‰	9,40	8,69-10,4	9,52	9,01-9,94
O ₂ , мл/л	7,28	5,64-9,76	6,89	5,79-8,01
O ₂ , %	114,60	100,90-142,30	111,40	97,50-135,51
БПК ₅ , мл/л	1,39	0,8-1,72	1,97	0,56-3,31
Окисл. мг О/л	7,09	6,5-7,69	5,86	4,93-6,79
NO ₂ , мкг/л	15,8	1,6-19,2	4,06	1,2-9,6
NO ₃ , мкг/л	238,8	9,0-1215,9	108,9	4,5-451,0
PO ₄ , мкг/л	81,9	6,3-175,6	46,15	9,4-106,0
Si, мкг/л	707,8	137-1512	627,8	418-797

По данным ЮгНИРО содержание токсичных элементов в донных отложениях юго-западной части Азовского моря не превышало геохимический фон, за исключением Zn в районе с. Семеновка. Концентрация Cu и Zn была выше, а Cd ниже в грунтах в районе с. Семеновка (Таблица 2.8).

Таблица 2.8 Содержание химических веществ в донных отложениях юго-западной части Азовского моря (по данным ЮгНИРО)

Параметр	с. Семеновка	с. Мысовое	Геохим. фон
1	2	3	4
Cu, мкг/г	23,9	14,4	40,0
Pb, мкг/г	9,75	9,31	20,0
Cd, мкг/г	0,06	0,14	0,30

Продолжение таблицы 2.8

1	2	3	4
Zn, мкг/г	99,0	45,3	94,0
As, мкг/г	31,8	27,2	11,0
Hg, мкг/г	0,04	0,03	0,40

При этом содержание Pb было ниже, а Zn и As выше в мышцах бычка-кругляка из района с. Семеновка, по сравнению с рыбами из второй исследуемой акватории (Таблица 2.9).

Таблица 2.9 Содержание токсичных элементов (мг/кг) в мышечной ткани бычка-кругляка из юго-западной части Азовского моря (ГП «Крымский региональный научно-производственный центр стандартизации, метрологии и сертификации», г. Симферополь)

Район	Cu	Pb	Zn	As	Hg
с. Семеновка	0,3	0,04	2,0	1,6	0,01
с. Мысовое	0,33	0,09	1,1	0,37	0,009
ПДК	10,0	1,0	40,0	5,0	0,4

Микробиологическое загрязнение воды в юго-западной части Азовского моря представлено в таблице 2.10.

Таблица 2.10 Уровень микробиологического загрязнения воды юго-западной части Азовского моря [155]

Район	БГКП КІ	Свежие фекальные загрязнения	МАФАМ
1	2	3	4
с. Семеновка			
20.04.04	240	+	1.2×10^3

Продолжение таблицы 2.10

1	2	3	4
14.06.04	> 1100	+	
с. Мысовое			
20.04.04	28	-	4.7×10^2
14.06.04	> 1100	+	
ПДК	менее 3	не допускается	100

Примечания: «+» – выявлены, «-» – не выявлены, БГКП – бактерии группы кишечной палочки, МАФАМ – мезофильные аэробные и факультативные анаэробные бактерии

Содержание бактерий группы кишечной палочки в воде обеих станций не превышает ПДК (5000). В обоих районах происходит увеличение коли-индекса в летний период. В районе с. Семеновка свежие фекальные загрязнения обнаружены в апреле и в июне, а в районе с. Мысовое – только в июне. Отмечено превышение допустимого содержания МАФАМ (100) в обоих исследованных районах. Бактерии рода Сальмонелла (*Salmonella*), Стафилококк (*Staphylococcus*) и бляшкообразующие не обнаружены.

Таким образом, исследуемые акватории в Арабатском заливе Азовского моря отличались в меньшей степени, о чем свидетельствуют данные гидрохимических характеристик морской воды и содержание токсичных элементов в грунтах и мышцах рыб.

Сравнительный анализ химического и микробиологического загрязнения прибрежной зоны Севастополя и юго-западной части Азовского моря позволил установить ряд отличий в характере загрязнения районов исследования в двух морях. Уровень нефтепродуктов в грунтах и микробного загрязнения (БГКП) в воде севастопольских бухт значительно выше по сравнению с таковыми в Арабатском заливе Азовского моря. В то же время распределение токсичных элементов в морской воде двух морей имело неоднозначный характер. Содержание всех металлов, за исключением Рb, было выше в воде акваторий г.

Севастополя, что подтверждается данными по содержанию токсичных элементов в мышечных тканях бычка-кругляка из районов исследования. Концентрация Cu, As и Hg в мышечной ткани черноморского бычка-кругляка достоверно выше значений соответствующих показателей у особей из Арабатского залива Азовского моря. Противоположная ситуация прослеживается только в случае с Pb ($0,33 \pm 0,02$ мг/кг против $0,088 \pm 0,005$ мг/кг в мышцах азовских бычков). Для Zn достоверных различий не выявлено, концентрация кадмия одинакова в тканях рыб из двух морей (Таблица 2.11) [48].

Таблица 2.11 Содержание токсичных элементов (мг/кг) в мышечной ткани бычка-кругляка, обитающего в прибрежной зоне Черного и Азовского морей [48]

Море	Cu	Pb	Zn	As	Hg
Черное	$0,64 \pm 0,07$	$0,088 \pm 0,005$	$3,24 \pm 0,20$	$0,92 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,004$
Азовское	$0,37 \pm 0,05^*$	$0,33 \pm 0,02^*$	$1,71 \pm 1,03$	$0,71 \pm 0,04^*$	$0,013 \pm 0,003^*$
ПДК	10,0	1,0	40,0	5,0	0,4

Примечание: * – достоверность различий между содержанием Cu, As ($p \leq 0,01$), Pb и Hg ($p \leq 0,001$) в мышечной ткани бычка-кругляка из двух морей

Таким образом, морские воды и грунты в районе Севастополя являются в большей степени загрязненными, чем в юго-западной части Азовского моря.

ГЛАВА 3 СЕЗОННЫЕ, ВОЗРАСТНЫЕ И ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ БЫЧКА- КРУГЛЯКА ИЗ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ

3.1 Прооксидантно-антиоксидантная система крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Метаболизм гидробионтов зависит от многих факторов, в том числе гидрологического режима водоема [152], что может быть причиной существенных отличий в обменных процессах у представителей одного вида из разных морей. В то же время ксенобиотики, присутствующие в среде обитания рыб, способны модифицировать физиолого-биохимический статус организма.

В связи с этим интерес представляло изучить состояние показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.

Сравнительный анализ активности АО ферментов в крови бычка-кругляка, отловленного в прибрежной зоне Черного и Азовского морей, представлен в таблице 3.1.

Таблица 3.1 Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, М \pm m) в крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Море	n	КАТ, мг H ₂ O ₂	СОД, усл. ед.	ПЕР, опт. ед.	ГР, нмоль НАДФН	ГТ, нмоль конъюгата	ИП ФАОА, усл. ед.
Черное	193	0,57 \pm 0,02	177,70 \pm 14,71	11,68 \pm 0,75	7,72 \pm 1,00	46,10 \pm 8,74	243,77
Азовское	169	0,87 \pm 0,03*	472,28 \pm 57,50*	6,00 \pm 0,40*	7,55 \pm 0,76	44,73 \pm 6,17	531,43

Примечание: * – различия достоверны

Активность ферментов у бычка-кругляка из двух морей существенно различается, за исключением глутатионзависимых энзимов. Активность ПЕР достоверно выше ($p \leq 0,001$) в эритроцитах крови черноморских бычков, тогда как СОД и КАТ – у рыб, обитающих в Азовском море ($p \leq 0,001$). Как следствие, ИП ФАОА более чем в 2 раза выше у азовских рыб по сравнению с черноморскими.

Интенсивность прооксидантных реакций в крови бычка-кругляка из двух морей оценивали по накоплению продуктов окисления белков в сыворотке крови (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 Содержание продуктов окисления белков (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$) в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Море	n	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ, усл. ед.
		альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
Черное	62	5,48±0,34	7,68±0,49	4,62±0,30	0,77±0,05	18,55
Азовское	60	3,33±0,17*	4,42±0,23*	2,73±0,15*	0,39±0,06*	10,87

Примечание: обозначения те же, что и в таблице 3.1

При всех длинах волн уровень окислительной модификации белковых молекул и ПО ОМБ был выше в сыворотке крови бычка-кругляка, обитающего в прибрежной зоне Севастополя.

Для удобства оценки состояния баланса прооксидантно-антиоксидантных процессов был введен коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия $KПАР = ИП ФАОА / ПО ОМБ$ (Рисунок 3.1).

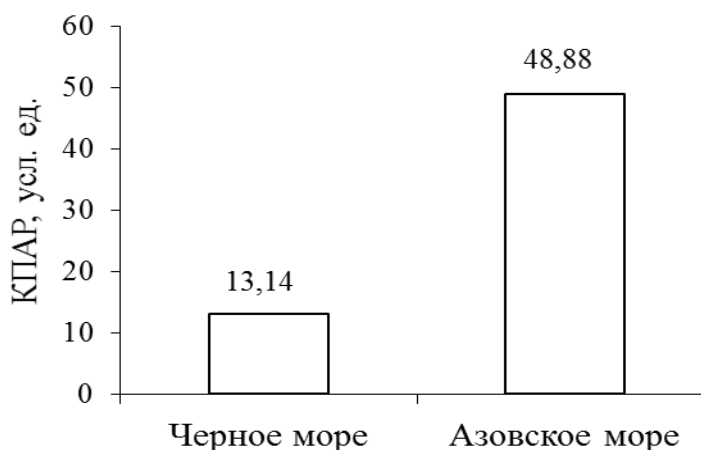


Рисунок 3.1 Коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Как можно видеть, значения КПАР в крови у рыб из Азовского моря почти в 4 раза выше, чем у черноморских бычков, что говорит о преобладании антиоксидантных реакций над перекисными в крови у азовских рыб.

Полученные различия могут быть следствием как географической разобщенности мест обитания этого вида, имеющих различные гидрохимические параметры, так и зависеть от уровня загрязнения акваторий.

3.2 Возрастные особенности прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Существенное влияние на состояние обмена веществ в организме оказывает возраст, поэтому целью данного раздела явилось изучение динамики активности ферментов антиоксидантной системы и уровня окислительной модификации сывороточных белков крови у разновозрастных рыб, обитающих в Черном и Азовском морях (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, $M \pm m$) в крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

лет	n	КАТ, мг H ₂ O ₂	СОД, усл. ед.	ПЕР, опт. ед.	ГР, нмоль НАДФН	ГТ, нмоль конъюгата	ИП ФАОА, усл. ед.
Черное море							
1-2	60	0,60±0,04	224,60±38,85	10,14±0,95	8,63± 1,29	41,64± 17,80	285,61
3	56	0,42±0,02*	147,01±18,38	14,16±1,47 *	3,47± 0,65*	18,87± 2,54	183,93
4	41	0,51±0,04•	158,80±23,77	10,40±2,01	4,79± 1,25*	17,70± 3,21	192,20
5	4	0,87±0,25	209,18±64,13	10,1±0,75•	6,44± 4,66	27,70± 2,69•■	254,29
Азовское море							
1-2	142	0,88±0,03	501,8±64,82	6,08±0,41	8,06± 0,89	51,36± 7,20	568,18
3	23	0,80±0,06	188,76±36,42*	5,58±0,80	4,75± 0,70*	33,52± 10,40	233,41
4	2	0,84±0,28	278,65±175,90	4,82±0,91	6,89± 2,36	6,7	297,9

Примечания: * – достоверность различий с 1-2-х летними рыбами; • – с 3-х летними; ■ – с 4-х летними; **жирным** шрифтом обозначена достоверность различий между одновозрастными особями из двух морей

Сравнительный анализ значений исследуемых параметров крови у рыб в возрасте 1 и 2 лет не показал достоверных различий, поэтому эти две возрастные группы были объединены в одну. Общей тенденцией для черноморских и

азовских бычков является снижение активности большинства АО ферментов у 3-х летних рыб по сравнению с 1-2-х летними. У черноморских бычков достоверные различия установлены для КАТ и ГР ($p \leq 0,001$), у азовских – для СОД ($p \leq 0,001$) и ГР ($p \leq 0,01$). В то же время у 4-х и 5-ти летних рыб отмечено увеличение АО активности по сравнению с 3-х летними. Различия достоверны для активности КАТ ($p \leq 0,05$) у 4-х летних, а также ГТ ($p \leq 0,05$) у 5-ти летних особей черноморского бычка-кругляка. В противоположность этому активность ПЕР достоверно увеличивалась ($p \leq 0,05$) в крови 3-годовиков ($p \leq 0,01$) и снижалась у 5-ти летних рыб ($p \leq 0,05$). В результате этого значение ИП ФАОА в 1,5 раза снижалось у черноморских бычков и почти в 2,5 раза у азовских рыб к 3 годам с последующим увеличением у старших возрастных групп.

Сравнительный анализ исследуемых биомаркеров крови одновозрастных особей бычка-кругляка из двух морей показал достоверное увеличение активности КАТ ($p \leq 0,001$) и СОД ($p \leq 0,001$) у 1-2-годовиков и КАТ ($p \leq 0,001$) – у 3-летних рыб из Азовского моря по сравнению с бычками, отловленными в прибрежье Севастополя. Активность ПЕР ($p \leq 0,01-0,001$) при этом превалировала у черноморских рыб над значениями этого фермента у азовских бычков во всех возрастных группах. Значения ИП ФАОА почти в 2 раза выше у 1-2-годовиков и в 1,5 раза у 4-х летних рыб из Азовского моря, по сравнению с показателями рыб из севастопольских бухт.

Увеличение содержания продуктов окисления белков было отмечено в крови черноморских бычков старших возрастных групп (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 Содержание продуктов окисления белков в сыворотке крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Черного и Азовского морей (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$)

лет	n	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ, усл. ед.
		альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
Черное море						
1-2	10	5,61±0,90	7,68±1,16	4,27±0,66	0,46±0,11	18,02
3	10	5,65±0,88	9,38±0,97	5,24±0,54	0,90±0,16*	21,17
4	5	7,40±1,68	10,69±2,28	6,54±1,63	0,99±0,19*	25,62
5	3	8,95±0,87*•	13,21±1,90*	7,55±1,02*	1,02±0,27	30,72
Азовское море						
1-2	50	3,46±0,19	4,53±0,25	2,81±0,16	0,40±0,07	11,20
3	9	2,99±0,47	4,05±0,61	2,53±0,43	0,34±0,10	9,91
4	1	1,60	2,65	0,75	0,10	

Примечания: обозначения те же, что и в таблице 3.3

Достоверные различия установлены между содержанием альдегидопроизводных нейтрального характера у 1-3-х летних и 5-ти летних рыб ($p \leq 0,05$), а также концентрацией кетопроизводных нейтрального и альдегидопроизводных основного характера ($p \leq 0,05$) в сыворотке 1-2- и 5-ти летних особей. Содержание кетопроизводных основного характера достоверно выше в сыворотке крови рыб в возрасте 3- и 4-х лет по сравнению с таковым у 1-2-х летних ($p \leq 0,05$).

Сравнительный анализ содержания продуктов окисления сывороточных белков у однополых рыб из двух морей показал преобладание процессов СРО в крови черноморских бычков, о чем свидетельствуют более высокие значения ПО ОМБ у рыб из Черного моря.

Рассчитанный на основании полученных нами значений ИП ФАОА и ПО ОМБ коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия представлен на рисунке 3.2.

Максимальные значения этого показателя у рыб из обоих морей обнаружены у 1-2-х летних бычков. У рыб в возрасте 3-х лет КПАР снижался: у черноморских бычков почти в 2, а у азовских – более чем в 2 раза по сравнению с 1-2-х летними. При сравнении этого показателя у рыб из обоих морей было установлено, что КПАР в 3 раза выше у 1-2-х летних и почти в 3 раза – у 3-х летних рыб из Азовского моря.

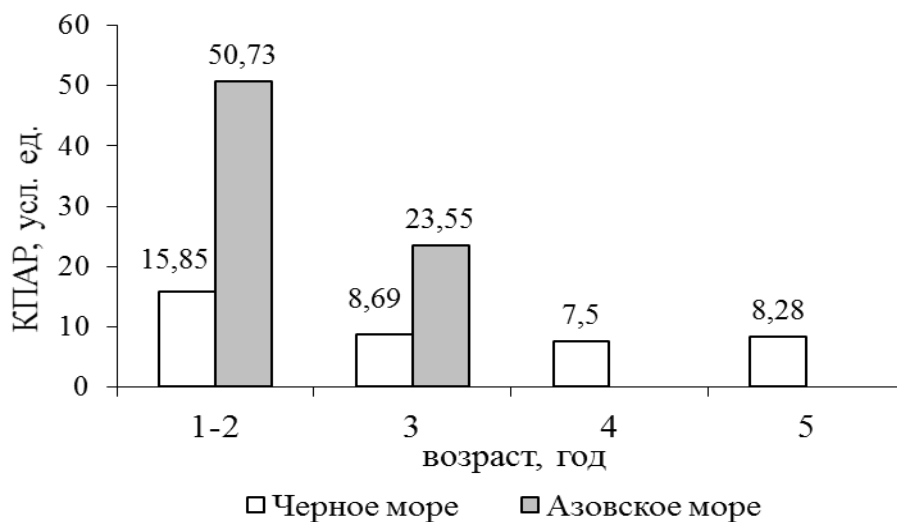


Рисунок 3.2 Коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Таким образом, были выявлены определенные возрастные изменения активности АО ферментов и уровня окислительной модификации белков в крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей. Активность большинства АО ферментов снижалась с возрастом, а содержание продуктов окисления белков – увеличилось.

3.3 Половые особенности прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка

Прооксидантно-антиоксидантная система крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Выявление особенностей метаболизма самок и самцов позволяет более детально понять внутрипопуляционную гетерогенность рыб на молекулярном уровне, а также определить ответные реакции организма на действие неблагоприятных факторов, в том числе антропогенного загрязнения, с учетом их гормонального статуса [114].

В связи с этим, анализ активности АО ферментов и процессов окислительной модификации сывороточных белков у самок и самцов рыб из Черного и Азовского морей позволит оценить их устойчивость к действию стрессовых факторов и антропогенной нагрузки на среду обитания.

Сравнительный анализ показал, что исследуемые ферменты крови в целом имеют сходство у самок и самцов, но по отдельным показателям они ниже у самцов, что в большей степени выражено у черноморских рыб (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, $M \pm m$) в крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

	n	КАТ, мг H_2O_2	СОД, усл. ед.	ПЕР, опт. ед.	ГР, нмоль НАДФН	ГТ, нмоль конъюг ата	ИП ФАОА, усл. ед.
1	2	3	4	5	6	7	8
Черное море							
самки	28	$0,65 \pm 0,06$	$320,20 \pm 61,19$	$10,20 \pm 1,44$	$8,21 \pm 1,65$	$69,52 \pm 44,43$	408,78
самцы	130	$0,49 \pm 0,02^*$	$148,80 \pm 13,58$ *	$11,83 \pm 0,94$	$5,28 \pm 0,71$	$19,24 \pm 1,91$	185,64

Продолжение таблицы 3.5

1	2	3	4	5	6	7	8
Азовское море							
самки	121	0,84±0,03	462,8±65,01	6,59±0,46	7,71±0,96	45,89±5,93	523,83
самцы	48	0,94±0,06	498,91±122,02	4,50±0,50*	7,31±1,27	50,92±13,67	562,58

Примечания: * – достоверность различий между активностью ферментов у самок и самцов ($p \leq 0,01-0,001$); **жирным** шрифтом обозначена достоверность различий у однополых особей из двух морей ($p \leq 0,05-0,001$)

В эритроцитах крови активность КАТ ($p \leq 0,01$) и СОД ($p \leq 0,01$) у самцов из Черного моря и ПЕР ($p \leq 0,001$) у рыб из Азовского моря достоверно ниже значений соответствующих показателей самок. В результате ИП ФАОА более чем в 2 раза ниже у самцов черноморских рыб, чем у самок, тогда как у азовских бычков значения этого показателя практически одинаковы.

Сравнительный анализ активности АО ферментов у однополых рыб из двух морей позволил установить определенные отличия. Активность КАТ ниже в крови самок из Черного моря ($p \leq 0,01$), а ПЕР – из Азовского ($p \leq 0,05$). Для других параметров достоверных различий не выявлено, хотя в целом ИП ФАОА самок азовских бычков выше значений этого показателя черноморских рыб. В то же время активность КАТ ($p \leq 0,001$), СОД ($p \leq 0,01$) и ГТ ($p \leq 0,05$) в крови самцов черноморских бычков была ниже, и только ПЕР ($p \leq 0,001$) превышала соответствующие параметры азовских рыб. В результате этого ИП ФАОА оказался в 3 раза ниже у самцов рыб из Черного моря.

В дальнейшем интерес представляло изучить интенсивность процессов окислительной модификации сывороточных белков у самцов и самок из обоих морей (Таблица 3.6).

Таблица 3.6 Содержание продуктов окисления белков в сыворотке крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного и Азовского морей (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$)

пол	n	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ, усл. ед.
		альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
Черное море						
самки	8	4,62±0,74	6,33±0,96	3,52±0,62	0,57±0,13	15,04
самцы	33	5,98±0,51	8,89±0,71*	5,28±0,40*	0,83±0,07	20,98
Азовское море						
самки	38	3,30±0,18	4,45±0,27	2,58±0,17	0,26±0,02	10,59
самцы	22	3,38±0,36	4,36±0,42	2,98±0,43	0,66±0,16	11,38

Примечание: обозначения те же, что в таблице 3.5

У самцов черноморских бычков содержание кетопроизводных нейтрального характера и альдегидопроизводных основного характера выше этих показателей у самок ($p \leq 0,05$), тогда как ПО ОМБ у самок составил 15,04 против 20,98 у самцов.

У азовских бычков межполовые различия выражались в достоверно большем содержании кетопроизводных основного характера в сыворотке крови самцов ($p \leq 0,05$), тогда как ПО ОМБ отличался незначительно.

В то же время содержание окисленных форм белков, определяемых при всех длинах волн, оказалось выше в сыворотке крови самцов черноморских бычков ($p \leq 0,001$), о чем свидетельствует значение ПО ОМБ – 20,98 против 11,38 у самцов из Азовского моря. Существенных различий между исследуемыми показателями у самок не выявлено, за исключением достоверно большего содержания кетопроизводных основного характера у черноморских рыб. ПО ОМБ почти в 1,5 раза ниже у азовских бычков.

Коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови разнополых особей бычка-кругляка из двух морей представлен на рисунке 3.3

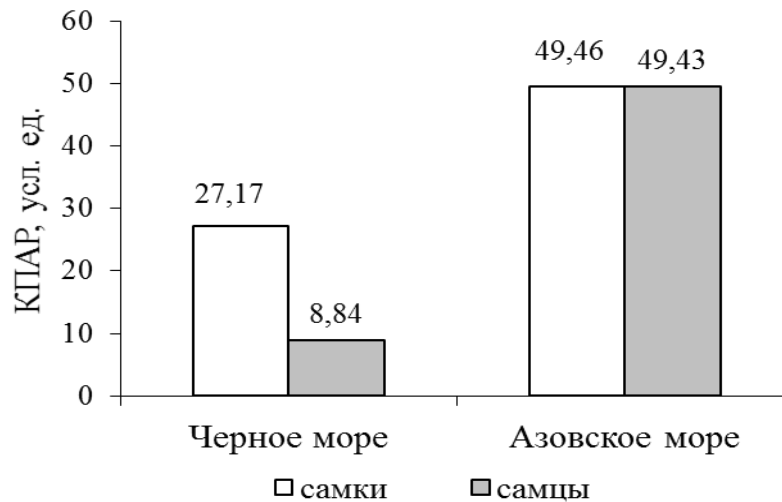


Рисунок 3.3 Коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Этот показатель в 3 раза выше у самок черноморских рыб по сравнению с КПАР самцов и одинаков у азовских рыб. Сравнительный анализ КПАР у однополых особей из двух морей позволил установить значительное превосходство этого коэффициента у азовских бычков – почти в 2 раза у самок, и более чем в 5,5 раз у самцов.

Таким образом, результаты исследований показали наличие значительных половых отличий активности АО ферментов и содержания продуктов окисления сывороточных белков в крови черноморских рыб, тогда как у азовских бычков они выражены в меньшей степени.

Состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в зависимости от стадии зрелости гонад

Годовой цикл большинства видов рыб принято разделять на преднерестовый период (нагул), нерест, посленерестовый нагул и зимовку. Эти периоды связаны с изменением не только поведенческих, но и метаболических

реакций в организме рыб [12; 149], что отражается на работе систем поддержания гомеостаза.

На основании этого было изучено влияние стадии репродуктивного цикла особей на динамику активности АО ферментов и уровень окислительной модификации сывороточных белков в крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.

Как можно видеть из таблицы 3.7, у самок черноморского бычка-кругляка активность большинства АО ферментов возрастает в период нереста, для КАТ различия достоверны с показателем преднерестового периода ($p \leq 0,05$), для СОД и ГР с периодом покоя ($p \leq 0,05$ и $0,01$ соответственно). Как следствие, ИП ФАОА увеличивался в ряду покой \rightarrow преднерестовый период \rightarrow нерест.

Таблица 3.7 Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, $M \pm m$) крови самок и самцов бычка-кругляка из побережья Севастополя (Черное море) в зависимости от стадии репродуктивного цикла

фермент	стадия репродуктивного цикла			
	покой	преднерестовый	нерест	посленерестовый
1	2	3	4	5
самки				
	n=3	n=2	n=23	-
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,50±0,19	0,50±0,01	0,67±0,07 [•]	-
СОД, усл. ед.	133,20±62,45	242,07±70,70	354,36±71,88*	-
ПЕР, опт. ед.	8,07±2,36	9,10±2,30	10,61±1,72	-
ГР, нмоль НАДФН	2,75±0,69	10,43±3,10	8,88±1,95*	-
ГТ, нмоль конъюгата	7,97±0,53	5,68	100,74±25,30	-
ИП ФАОА	152,49	267,78	475,26	-
самцы				
	n=17	n=36	n=76	-
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,46±0,04	0,52±0,03	0,49±0,02	-
СОД, усл. ед.	96,96±17,81	169,85±30,02*	149,50±17,61*	-

Продолжение таблицы 3.7

1	2	3	4	5
ПЕР, опт. ед.	12,91±2,05	11,14±1,29	11,97±1,42	-
ГР, нмоль НАДФН	4,22±1,88	4,66±1,17	5,84±1,01	
ГТ, нмоль конъюгата	18,11±4,60	20,95±4,11	19,01±2,46	-
ИП ФАОА	132,66	207,12	186,81	-

Примечания: * – достоверность различий ($p \leq 0,01-0,05$) с периодом покоя; • – с преднерестовым; ■ – с нерестовым; **жирным** шрифтом обозначены достоверные межполовые различия ($p \leq 0,05-0,01$)

У самцов черноморского бычка-кругляка наблюдали достоверное увеличение активности СОД ($p \leq 0,05$) в период созревания гонад, с последующим ее снижением во время нереста ($p \leq 0,05$). Для других ферментов не выявлено достоверных отличий, хотя сходные с СОД тенденции отмечены для КАТ и ГТ. Таким образом, максимальные значения ИП ФАОА зафиксированы в период созревания половых желез.

Сравнительный анализ АО ферментов крови самок и самцов бычка-кругляка из севастопольских акваторий, находящихся на соответствующей стадии зрелости половых желез позволил установить, что активность ГТ ($p \leq 0,05$) в период покоя была достоверно выше, а КАТ ($p \leq 0,05$), СОД ($p \leq 0,01$) и ГТ ($p \leq 0,01$) во время нереста ниже в эритроцитах крови самцов бычка-кругляка по сравнению с таковой у самок.

Полученные значения ИП ФАОА демонстрируют рост общей активности ферментов АОС у самок и самцов черноморского бычка-кругляка в период созревания гонад по сравнению с периодом покоя. Во время нереста этот показатель у самцов уменьшался, а у самок увеличивался и превосходил таковой у самцов в 2,5 раза.

Динамика активности АО ферментов в эритроцитах крови азовских бычков на разных этапах зрелости половых желез представлена в таблице 3.8.

Таблица 3.8 Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, $M \pm m$) крови самок и самцов бычка-кругляка из юго-западной части Азовского моря в зависимости от стадии репродуктивного цикла

фермент	стадия репродуктивного цикла			
	покой	преднерестовая	нерест	посленерестовая
самки				
	-	n=8	n=105	n=8
КАТ, мг H_2O_2	-	1,01±0,10	0,83±0,03	0,80±0,05
СОД, усл. ед.	-	418,9±178,3	490,08±74,40	240,00±48,53 [■]
ПЕР, опт. ед.	-	7,17±2,45	6,78±0,49	3,59±0,64 [■]
ГР, нмоль НАДФН	-	5,76±2,63	7,88±1,14	7,42±1,4
ГТ, нмоль конъюгата	-	37,92 ± 8,87	48,78±7,11	27,61±7,72 [■]
ИП ФАОА	-	470,76	556,35	279,42
самцы				
	-	n=6	n=27	n=16
КАТ, мг H_2O_2	-	0,53±0,05	0,99±0,07[•]	0,97±0,12 [•]
СОД, усл. ед.	-	106,63±57,96	559,46±150,10 [•]	486,84±105,59[•]
ПЕР, опт. ед.	-	6,04±1,10	4,80±0,76	3,34±0,60 [•]
ГР, нмоль НАДФН	-	4,36±1,24	8,02±1,69	7,12±2,53
ГТ, нмоль конъюгата	-	3,48±0,43	53,77±15,73 [•]	19,02±5,91 ^{■•}
ИП ФАОА	-	121,04	627,04	517,29

Примечания: обозначения те же, что и в таблице 3.7

У самок азовского бычка-кругляка отмечена высокая активность АО ферментов в преднерестовый и нерестовый периоды, тогда как после нереста активность СОД ($p \leq 0,05$), ПЕР ($p \leq 0,001$) и ГТ ($p \leq 0,05$) достоверно снижалась. Максимальные значения ИП ФАОА отмечены во время нереста, минимальные – в посленерестовый период.

У самцов из Азовского моря активность КАТ, СОД и ГТ достоверно выше в нерестовую ($p \leq 0,001$; 0,05; 0,01 соответственно) и посленерестовую ($p \leq 0,001$;

0,01; 0,05 соответственно) стадии по сравнению с периодом созревания гонад. Для ПЕР тенденция противоположная, активность фермента в посленерестовый период достоверно снижена ($p \leq 0,05$) по сравнению с посленерестовым. В результате, максимум ферментативной АО активности приходился на время нереста, тогда как минимальные значения ИП ФАОА обнаружены в преднерестовый период.

Сравнительный анализ активности АО ферментов в эритроцитах крови самок и самцов из Азовского моря, находящихся на соответствующей стадии зрелости гонад, позволил установить, что активность КАТ ($p \leq 0,001$) и ГТ ($p \leq 0,05$) достоверно выше у самок бычка-кругляка в преднерестовый период. Во время нереста активность КАТ выше ($p \leq 0,05$) у самцов, а ПЕР ($p \leq 0,05$) у самок. В посленерестовый период отмечали достоверное снижение активности СОД у самок азовского бычка кругляка. Следует отметить, что ИП ФАОА у самцов почти в 4 раза ниже в период созревания гонад и почти в 2 раза выше после нереста, чем соответствующие значения этого показателя у самок, тогда как в нерестовый период значения ИП ФАОА у разнополых особей практически не отличались.

Анализ полученных результатов у однополых особей из двух морей позволил установить ряд особенностей. Так, максимальная активность ГТ у самок черноморского и самок и самцов азовского бычка-кругляка наблюдалась во время нереста и снижалась в посленерестовый период. Значения ИП ФАОА также максимальны у перечисленных групп в нерестовый период, хотя существенно ниже у рыб из Черного моря, за исключением ИП ФАОА самцов в преднерестовый период.

Уровень окислительной модификации сывороточных белков в крови самок и самцов из двух морей в разные периоды репродуктивной активности представлен в таблице 3.9.

Таблица 3.9 Содержание продуктов окисления белков (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$) в сыворотке крови самок и самцов бычка-кругляка из побережья Севастополя (Черное море) в зависимости от стадии репродуктивного цикла

стадия репродуктивного цикла	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ
	альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
	самки				
покой	-	-	-	-	-
преднерестовая	-	-	-	-	-
нерест, n=6	5,04±0,81	6,89±1,05	3,92±0,69	0,64±0,16	16,49
посленерестовая	-	-	-	-	-
	самцы				
покой	-	-	-	-	-
преднерестовая, n=15	7,0±0,57	10,52±0,93	6,06±0,53	0,87±0,11	24,45
нерест, n=16	5,0±0,80•	7,51±1,04•	4,66±0,60	0,79±0,07	17,96
посленерестовая	-	-	-	-	-

Примечания: * – достоверность различий ($p \leq 0,01-0,05$) с периодом покоя; • – с преднерестовым; ■ – с нерестовым; **жирным** шрифтом обозначены достоверные межполовые различия ($p \leq 0,05-0,01$)

Содержание продуктов нейтрального характера достоверно выше в сыворотке крови самцов черноморского бычка-кругляка во время нереста ($p \leq 0,05$) по сравнению с преднерестовым периодом. Подобная тенденция отмечена и для продуктов основного характера, однако различия не достоверны. ПО ОМБ выше в преднерестовый период.

Достоверных отличий между содержанием окисленных форм белков в сыворотке крови черноморских самок и самцов не выявлено.

Уровень окислительной модификации в сыворотке крови азовских рыб в разные периоды репродуктивной активности не показал достоверных отличий, однако и для самок, и для самцов максимальное содержание продуктов окисления сывороточных белков приходилось на посленерестовый период (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 Содержание продуктов окисления белков (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$) в сыворотке крови самок и самцов бычка-кругляка из юго-западной части Азовского моря в зависимости от стадии репродуктивного цикла

стадия репродуктивного цикла	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ
	альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
	самки				
покой	-	-	-	-	-
преднерестовая, n=2	3,75±0,82	4,72±0,92	3,0±1,0	0,23±0,04	11,7
нерест, n=30	3,18±0,19	4,26±0,29	2,46±0,16	0,25±0,03	10,15
посленерестовая, n=6	3,79±0,63	5,33±0,86	3,05±0,65	0,32±0,06	12,49
	самцы				
покой	-	-	-	-	-
преднерестовая, n=3	2,87±1,40	3,41±1,4	2,93±1,10	0,61±0,11	9,82
нерест, n=15	3,32±0,37	4,27±0,43	3,02±0,32	0,72±0,22	11,33
посленерестовая, n=4	4,0±1,2	5,41±1,4	2,91±0,97	0,46±0,14	12,78

Примечания: обозначения те же, что и в таблице 3.9

В то же время отмечено достоверное увеличение содержания кетопроизводных основного характера в сыворотке крови самцов азовского бычка-кругляка в нерестовый и преднерестовый периоды по сравнению с соответствующим показателем у самок ($p \leq 0,05$).

На основании полученных значений ИП ФАОА и ПО ОМБ нами был рассчитан КПАР для самок и самцов на каждой из стадий развития гонад.

Как видно на рисунке 3.4, КПАР у самцов черноморского бычка-кругляка в нерестовый период почти в 3 раза ниже значения этого коэффициента у самок и практически одинаков с таковым у самцов на стадии созревания половых желез.

У азовских бычков КПАР в 3 раза выше у самок, чем у самцов в преднерестовую стадию, тогда как во время нереста значения КПАР увеличиваются и выравниваются у самок и самцов. После нереста КПАР

снижается, особенно ощутимо у самок (почти в 2,5 раза), тогда как у самцов это выражено в меньшей степени.

Сравнительный анализ КПАР для однополых особей из Черного и Азовского морей показал существенное превалирование значения этого коэффициента у самок и самцов из Азовского моря во время нереста, тогда как в преднерестовый период КПАР незначительно отличался у самцов из двух морей.

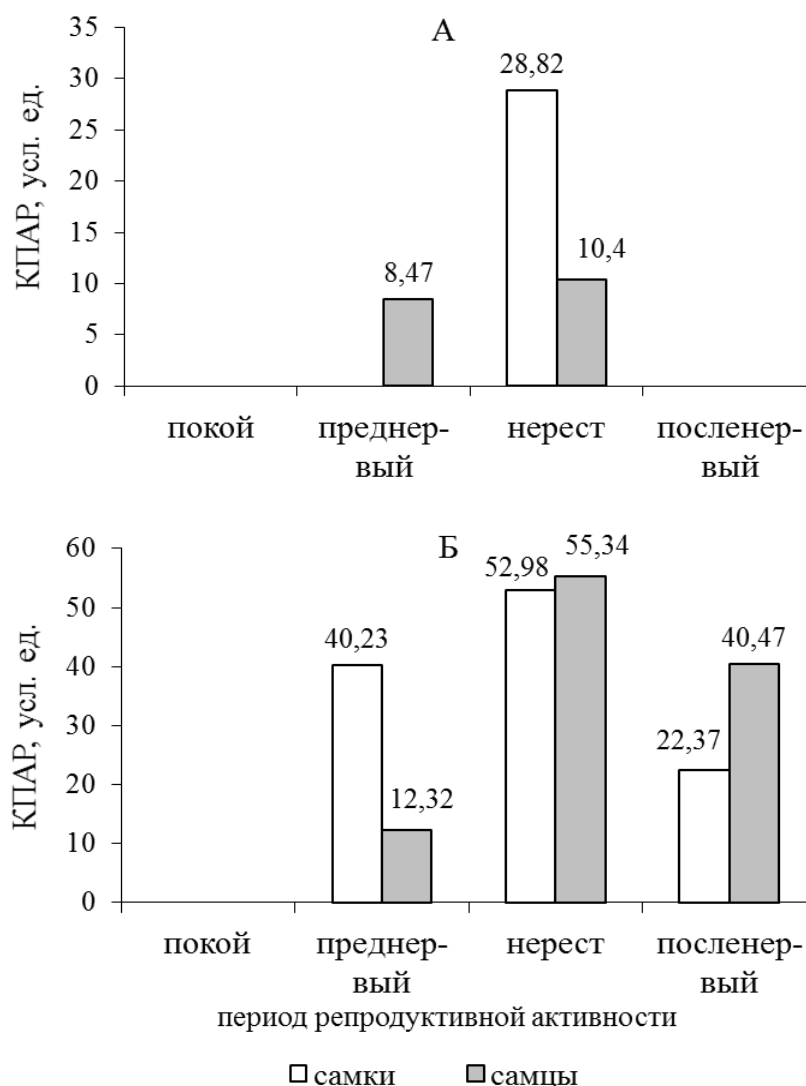


Рисунок 3.4 Коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного (А) и Азовского (Б) морей в разные периоды репродуктивного цикла

Таким образом, результаты исследования позволили установить значительное смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону

процессов СРО в период нереста у самцов черноморского бычка-кругляка, что, вероятно, связано с особенностями их нерестового поведения на фоне антропогенного прессинга. В то же время у рыб из Азовского моря выявлена противоположная тенденция.

3.4 Сезонные особенности прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Сезонные колебания гидрохимических параметров воды и связанные с ними физиологические ритмы приводят к естественным изменениям интенсивности и характера обменных процессов в организме гидробионтов [6; 121]. Таким образом, следует ожидать, что уровень метаболизма и его сезонные колебания будут значительно различаться у представителей одного вида, обитающих в разных экологических условиях.

В связи с этим была изучена сезонная динамика активности антиоксидантных ферментов и окислительной модификации сывороточных белков в крови бычков Черного и Азовского морей с учетом особенностей гидрохимических характеристик исследуемых районов в разные периоды года.

Значения активности АО ферментов крови у рыб из Черного и Азовского морей представлены в таблице 3.11. Сезонные колебания активности АО ферментов более выражены у черноморских бычков, чем у азовских.

Активность большинства АО ферментов (КАТ, СОД, ГР, ГТ), за исключением ПЕР, повышается в крови черноморского бычка-кругляка в весенний период. Снижение активности КАТ и глутатионзависимых ферментов ($p \leq 0,05$) показано летом, а КАТ осенью ($p \leq 0,01$) по сравнению с весной. Для ПЕР тенденция противоположная, различия достоверны между зимним и весенним сезонами ($p \leq 0,01$).

Таблица 3.11 Активность антиоксидантных ферментов (на мг Нb/мин, $M \pm m$) крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в разные сезоны года

	Зима	Весна	Лето	Осень
Черное море				
КАТ, мг H_2O_2	0,36 \pm 0,05	0,63\pm0,03*	0,45\pm0,03[■]	0,24\pm0,12[■]
СОД, усл. ед.	24,50 \pm 5,51	196,16 \pm 19,86*	142,47\pm21,01*	185,80\pm38,91*
ПЕР, опт. ед.	22,29 \pm 3,99	9,90 \pm 1,41*	14,30 \pm 1,82	8,35 \pm 6,14
ГР, нмоль НАДФН	3,24 \pm 2,39	9,96 \pm 1,40*	3,69\pm0,85[■]	3,67
ГТ нмоль, конъюгата	18,62 \pm 12,91	59,11 \pm 12,15*	15,54\pm2,75[■]	5,46
ИП ФАОА	69,01	275,76	176,45	203,52
Азовское море				
КАТ, мг H_2O_2	-	0,86 \pm 0,07	0,86 \pm 0,03	0,93 \pm 0,09
СОД, усл. ед.	-	295,09 \pm 81,03	523,80 \pm 76,89 [■]	379,10 \pm 75,31
ПЕР, опт. ед.	-	4,88\pm0,68	6,70\pm0,47[■]	3,52 \pm 0,43 [•]
ГР, нмоль НАДФН	-	6,64\pm0,80	7,84 \pm 1,12	7,68 \pm 1,70
ГТ нмоль, Конъюгата	-	39,05 \pm 10,68	49,00 \pm 6,92	53,92 \pm 26,30
ИП ФАОА	-	346,52	588,20	445,15

Примечания: * - достоверность различий с зимним сезоном; [■] – с весенним; [•] – с летним; **жирным шрифтом** обозначено достоверное снижение активности АО ферментов крови между азовскими и черноморскими бычками в соответствующий сезон года

ИП ФАОА весной (275,76) почти в 4 раза выше значения этого показателя зимой (69,01), и в 1,3-1,5 раза осенью (203,52) и летом (176,45) соответственно.

У азовских бычков активность СОД ($p \leq 0,05$) и ПЕР ($p \leq 0,05$) максимальных значений достигает летом и снижается осенью, когда уровень ПЕР достоверно падал ($p \leq 0,001$). Активность других ферментов изменялась незначительно. Максимальное значение ИП ФАОА зафиксировано летом – 588,20, против 346,52 и 445,15 весной и осенью соответственно.

При сравнении активности АО ферментов у рыб из двух морей был обнаружен ряд особенностей. Весной активность КАТ была ниже ($p \leq 0,01$), а ПЕР и ГР достоверно выше ($p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$ соответственно) в крови черноморских бычков по сравнению с этими показателями у рыб из Азовского моря. Летом ситуация меняется, активность всех ферментов, за исключением ПЕР, выше ($p \leq 0,01-0,001$) у азовских бычков. Для СОД и КАТ эта тенденция сохраняется и в осеннее время года ($p \leq 0,05$).

В дальнейшем интерес представляло оценить уровень окислительной модификации белков сыворотки крови бычка-кругляка из двух морей (Таблица 3.12).

Таблица 3.12 Содержание продуктов окисления белков (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$) в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в разные сезоны года

Сезон	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ
	альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
	Черное море				
Зима	5,09±0,69	6,57±0,66	3,47±0,39	0,38±0,12	15,51
Весна	5,50±0,48	8,35±0,69	4,97±0,36*	0,91±0,10*	19,73
Лето	6,88±2,10	8,95±2,60	5,59±2,06	0,85±0,24	29,15
Осень	9,15±1,48■	14,05±2,95*	7,77±1,72*	0,81±0,30	31,78
	Азовское море				
Зима	-	-	-	-	-
Весна	3,19±0,58	4,37±0,71	2,35±0,56	0,35±0,22	10,26
Лето	3,26±0,19	4,29±0,25	2,74±0,16	0,40±0,08	10,69
Осень	3,80±0,68	5,23±0,83	2,90±0,60	0,40±0,09	12,33

Примечания: * – достоверность различий с зимним сезоном; ■ – с весенним; ● – с летним; **жирным шрифтом** обозначено достоверное снижение содержания

продуктов окисления сывороточных белков между азовскими и черноморскими бычками в соответствующий сезон года

Содержание продуктов окислительной модификации сывороточных белков достоверно увеличивалось в крови рыб из побережья Севастополя осенью по сравнению с весенним периодом для альдегидопроизводных нейтрального характера ($p \leq 0,05$), и зимним – для кетопроизводных нейтрального и альдегидопроизводных основного характера ($p \leq 0,05$). Для продуктов основного характера показано достоверное увеличение их содержания весной по сравнению с зимним периодом ($p \leq 0,01$).

Уровень окислительной модификации белков в сыворотке рыб из Азовского моря изменялся незначительно, проявляя тенденцию к увеличению в осенний период (кроме кетопроизводных основного характера), во всех случаях различия не достоверны. Как следствие, максимальное значение ПО ОМБ отмечено осенью.

Сравнительный анализ содержания продуктов окисления белков у рыб из двух морей показал достоверное увеличение их концентрации в сыворотке черноморских бычков весной и осенью. Значения ПО ОМБ у рыб из Черного моря достоверно выше соответствующих показателей азовских бычков в течение года. Для оценки состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса крови азовских и черноморских бычков в разные сезоны года нами был рассчитан коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия (Рисунок 3.5).

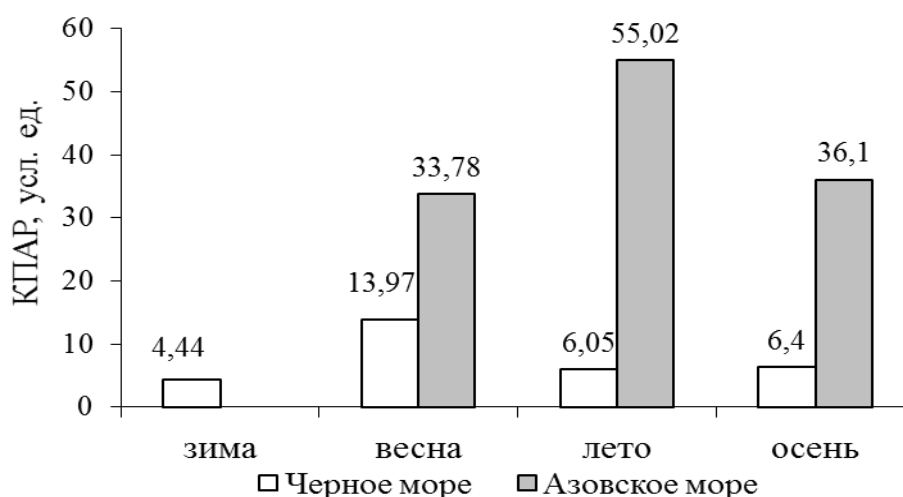


Рисунок 3.5 Коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в разные сезоны года

У черноморского бычка-кругляка КПАР увеличивается весной и снижается в летне-осенний период. У рыб из Азовского моря этот показатель возрастает летом, убывая в осеннее время года, и существенно превосходит значения КПАР у черноморских бычков весной, летом и осенью.

Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что уровень окислительной модификации и АО процессов в крови бычка-кругляка могут зависеть от физиологического состояния особей, а также от изменения гидрохимических характеристик воды и антропогенной нагрузки на исследуемые акватории в разные сезоны года.

ГЛАВА 4 ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА ИЗ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ

4.1 Характеристика ЭФ-спектров белков сыворотки крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Как известно, белки сыворотки крови – компоненты динамической, многофункциональной системы, на состав которых оказывают влияние как естественные, так и антропогенные факторы [17].

В связи с этим интересным представлялось изучить электрофоретические параметры белков сыворотки крови и статистические показатели числа фракций в ЭФ-спектрах бычка-кругляка из двух морей, отличающихся по экологическим характеристикам и уровню загрязнения в них. Денситограмма сыворотки крови черноморского бычка-кругляка представлена на рисунке 4.1 [106].

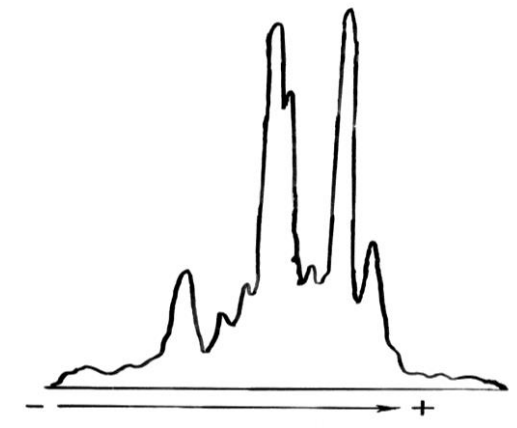


Рисунок 4.1 Денситограмма сыворотки крови бычка-кругляка из прибрежной зоны Севастополя (Черное море)

Сравнительный анализ «стандартных» ЭФ-спектров белков сыворотки крови бычка-кругляка, отловленного в прибрежье Черного и Азовского морей, позволил установить ряд отличий, которые выражались в разном количестве белковых компонентов, входящих в ЭФ-е спектры, их распределении и подвижности внутри белковых зон (Рисунок 4.2). Наиболее гетерогенным по

числу белковых компонентов является «стандартный» ЭФ-спектр азовских бычков – 24 фракции, против 19 для черноморских рыб. «Стандартный» ЭФ-спектр последних включал на 1 фракцию меньше в трансферриновой и на 2 в предстартовой и преальбуминовой зонах. В других белковых зонах количество фракций одинаково (посттрансферриновая – 3, постальбуминовая – 9, альбуминовая – 1), хотя постальбуминовая зона в «стандартном» ЭФ-спектре черноморских бычков характеризуется большим насыщением диффузными фракциями, чем у азовских рыб. В то же время обнаружено увеличение Кэф (коэффициента электрофоретической подвижности) альбумина черноморских бычков (0,75-0,80) против Кэф (0,7-0,73) рыб, отловленных в юго-западной части Азовского моря (Рисунок 4.2).

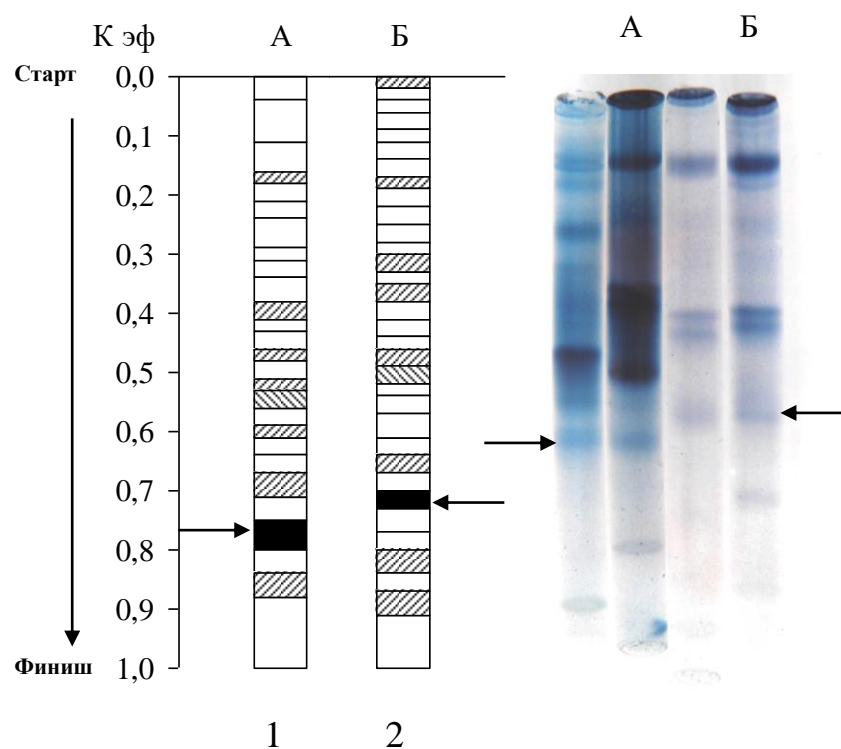


Рисунок 4.2 Стандартные ЭФ-спектры (1) и фото электрофореграмм (2) белков сыворотки крови бычка-кругляка из Черного (А) и Азовского (Б) морей. (→) – альбумин; Кэф – коэффициент относительной электрофоретической подвижности; Финиш – свидетель (Бромфеноловый синий), принятый за 1,0

Статистические показатели количества белковых полос в ЭФ-спектрах азовских и черноморских бычков приведены в таблице 4.1. Снижение верхних и

нижних пределов числа фракций, а также достоверное снижение среднего числа фракций ($p \leq 0,001$) были выявлены в ЭФ-спектрах черноморских рыб по сравнению с таковыми у азовских бычков.

Таблица 4.1 Статистические показатели числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Параметры	Черное море	Азовское море
Количество особей, n	84	173
Пределы числа фракций в ЭФ-спектрах	7-22 (15)	8-29 (21)
Среднее число фракций в ЭФ-спектрах, $M \pm m$	$14,9 \pm 0,3$	$17,4 \pm 0,3^*$
Количество вариантов ЭФ-спектров по числу фракций в них	14	20
Число «редких» фракций, %	38	20
Коэффициент вариации, CV, %	18,7	20,0
Пределы ЭФ-подвижности	0,00-1,33	0,00-1,40
Число фракций в «стандартном» ЭФ-спектре, в том числе по зонам:	19	24
преальбуминовая (I)	1	3
альбуминовая (II)	1	1
постальбуминовая (III)	9	9
трансферриновая (IV)	3	4
посттрансферриновая (V)	3	3
предстартовая (VI)	2	4
Кэф альбумина	0,75-0,80	0,70-0,73

Примечание: * – достоверность различий

Число «редких» фракций у черноморских рыб выше значения этого показателя у азовских бычков за счет снижения количества белковых полос в предстартовой и преальбуминовой зонах, что отмечалось выше. Коэффициент вариации не имеет существенных отличий.

Таким образом, при сравнении «стандартных» ЭФ-спектров и статистических показателей числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови бычка-кругляка, отловленного в Азовском и Черном морях, были обнаружены определенные различия, которые могут быть следствием генетических особенностей, разного уровня антропогенной нагрузки в акваториях, а также экологической специфичности и географической разобщенности мест обитания вида.

4.2 Эколого-физиологические особенности содержания и электрофоретических свойств альбумина сыворотки крови бычка-кругляка

Среди биомаркеров, позволяющих оценить состояние рыб и среды их обитания, *сывороточный альбумин* является важным диагностическим показателем, широко применяемым для выявления интоксикаций, вызванных различными загрязнителями. Поступление в организм избыточных концентраций ксенобиотиков способствует интенсификации процессов свободнорадикального окисления и, как следствие, повышению содержания продуктов ПОЛ и уровня эндогенной интоксикации. В первом случае взаимодействие белковых аминокрупп с продуктами окисления липидов приводит к увеличению отрицательного заряда и конформационным преобразованиям альбумина, во втором – к блокированию или аллостерическим изменениям центров связывания на молекуле белка. В результате этих процессов нарушается транспортная функция альбумина, от чего зависит течение и исход многих интоксикаций, снижается его концентрация [7; 262]. В то же время необходимым условием для корректного применения любого показателя в качестве биомаркера является анализ пределов его естественной вариабельности в популяциях изучаемых видов.

В связи с этим интерес представляло изучить половые, возрастные и сезонные особенности электрофоретических характеристик и содержания альбумина в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.

Эколого-физиологические и сезонные особенности концентрации альбумина в сыворотки крови бычка-кругляка

Результаты исследований показали, что концентрация альбумина в сыворотке крови азовских бычков составляет 16,09 г/л, что в 3 раза больше ($p \leq 0,001$), чем в сыворотке рыб из Черного моря (5,68 г/л).

Сравнительный анализ содержания альбумина в сыворотке бычка-кругляка разных возрастных групп из Черного моря не показал достоверных отличий, тогда как у азовских бычков наблюдали значительное его снижение у старших рыб по сравнению с 2-х и 3-х летними ($p \leq 0,001$) (Рисунок 4.3). Коэффициент корреляции между возрастом рыб и концентрацией альбумина у азовских бычков составил $r = -0,85$.

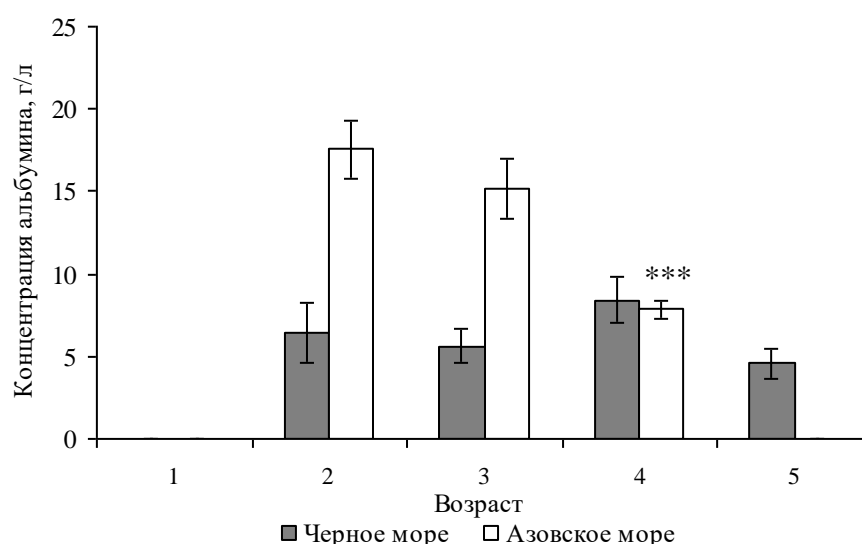


Рисунок 4.3 Концентрация альбумина (г/л) в сыворотке крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Черного и Азовского морей; * – достоверность различий с 2-х летними рыбами; ** - с 3-х летними

В то же время уровень альбумина достоверно выше ($p \leq 0,01$) в сыворотке крови 2-х и 3-х годовалых рыб из Азовского моря по сравнению с таковым у соответствующих возрастных групп черноморских бычков. У особей в возрасте 4-х лет содержание альбумина практически не отличалось.

Концентрация альбумина в сыворотке крови самок и самцов бычка-кругляка из обоих морей представлена на рисунке 4.4.

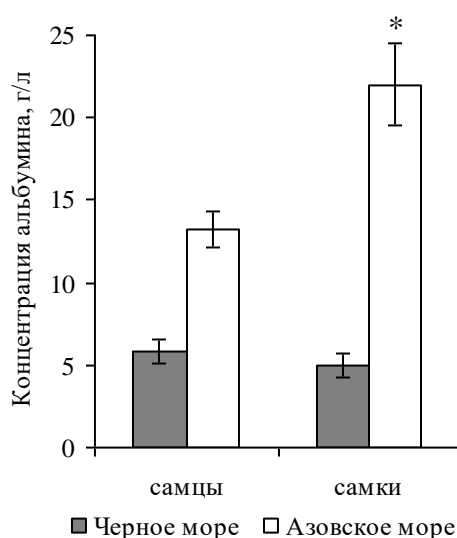


Рисунок 4.4 Концентрация альбумина (г/л) в сыворотке крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного и Азовского морей; * – достоверность различий

Содержание альбумина не имело достоверных отличий у разнополых особей черноморских бычков, тогда как у самок азовских рыб превосходило значение соответствующего параметра самцов почти в 2 раза ($p \leq 0,01$).

В дальнейшем интерес представляло оценить динамику концентрации альбумина в зависимости от репродуктивной активности бычка-кругляка (Рисунок 4.5).

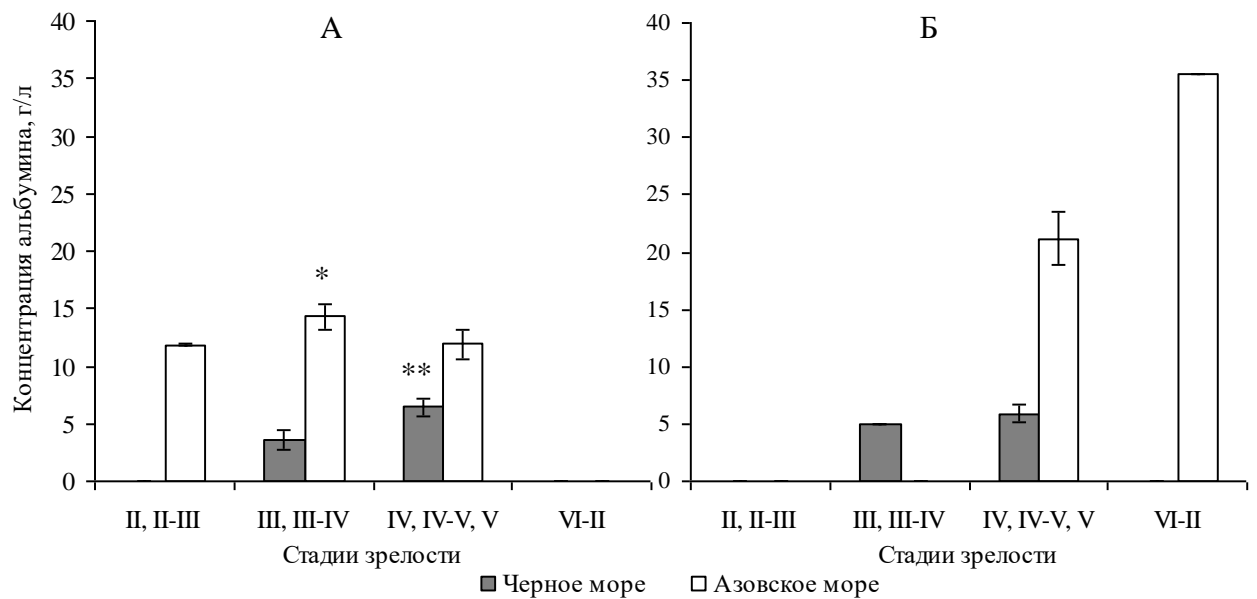


Рисунок 4.5 Концентрация альбумина в сыворотке крови самцов (А) и самок (Б) бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в зависимости от стадии зрелости гонад; * – достоверность различий с II, II-III стадией зрелости ** – с III, III-IV

II, II-III – стадия покоя; III, III-IV – преднерестовая стадия IV, IV-V, V – нерест; VI-II – посленерестовая стадия

Уровень альбумина в сыворотке крови самцов черноморских бычков выше ($p \leq 0,05$) в нерестовый период по сравнению с преднерестовым. У самцов азовских рыб концентрация этого белка достоверно возросла ($p \leq 0,05$) в период подготовки к нересту относительно стадии покоя. Содержание альбумина в сыворотке крови самок черноморского бычка-кругляка в преднерестовый и нерестовый периоды не отличались. В связи с тем, что гонады практически всех самок в выборке азовского бычка-кругляка находились в стадии нереста (IV-V), мы можем говорить только о тенденции к увеличению концентрации альбумина в сыворотке крови рыб в посленерестовый период (период осеннего откорма) по сравнению с нерестом.

Концентрация альбумина в сыворотке крови черноморских бычков в меньшей степени зависела от сезонных изменений, чем у рыб, обитавших в

прибрежье Азовского моря. Значение этого показателя достоверно выше в сыворотке азовских бычков летом по сравнению с весенним ($p \leq 0,001$) и осенним ($p \leq 0,001$) периодами (Рисунок 4.6).

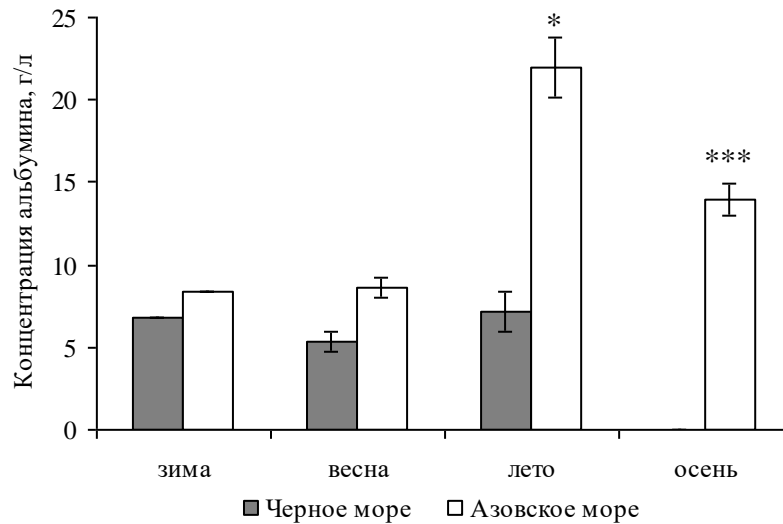


Рисунок 4.6 Концентрация альбумина (г/л) в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в разные сезоны года; * – достоверность различий с весенним сезоном; ** – с летним сезоном

Таким образом, нами были установлены половые, возрастные и сезонные особенности содержания альбумина в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.

Эколого-физиологические и сезонные особенности электрофоретических характеристик альбумина сыворотки крови бычка-кругляка

Как было показано, содержание альбумина зависит от сезона, стадии зрелости гонад, половой принадлежности и возраста особей. Электрофоретические характеристики этого белка также зависели от перечисленных выше факторов.

Электрофоретические флуктуации подвижности сывороточного альбумина в крови разновозрастных особей бычка-кругляка из двух морей представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 Электрофоретическая подвижность альбумина сыворотки крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Возраст, лет	Сывороточный альбумин Кэф (мин - макс)	
	Черное море	Азовское море
1 – 1+	0,74 – 0,78 (n = 8)	0,68 – 0,70 (n = 78)
2 – 2+	0,75 – 0,79 (n = 36)	0,69 – 0,73 (n = 68)
3 – 3+	0,72 – 0,77 (n = 22)	0,70 – 0,73 (n = 15)
4 – 4+	0,76 – 0,78 (n = 14)	-

Кэф альбумина в сыворотке крови азовских бычков варьировал в меньшей степени, чем у черноморских, и проявлял тенденцию к увеличению у рыб с возрастом. У черноморских бычков наблюдали снижение относительной электрофоретической подвижности сывороточного альбумина у 3-х летних рыб по сравнению с другими возрастными группами.

Представленные в таблице 4.3 данные свидетельствуют об отсутствии межполовых отличий в подвижности сывороточного альбумина. В то же время значения Кэф альбумина у самок и самцов из Черного моря значительно выше, чем у азовских бычков.

Таблица 4.3 Электрофоретическая подвижность альбумина сыворотки крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного и Азовского морей

Пол	Сывороточный альбумин Кэф (мин - макс)	
	Черное море	Азовское море
самцы	0,76 – 0,79 (n = 66)	0,69 – 0,73 (n = 48)
самки	0,74 – 0,79 (n = 18)	0,70 – 0,73 (n = 118)

Сравнительный анализ Кэф альбумина у рыб в разные периоды репродуктивного цикла позволил установить определенные особенности (Таблица 4.4). Подвижность альбумина увеличивается в ЭФ-спектре самок и самцов бычка-кругляка из обоих морей по мере созревания гонад и достигает максимальных значений в период нереста.

Таблица 4.4 Электрофоретическая подвижность альбумина сыворотки крови самцов и самок бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в зависимости от стадии зрелости гонад

Стадия репродуктивного цикла	Сывороточный альбумин Кэф (мин - макс)	
	Черное море	Азовское море
самцы		
покой	0,72 – 0,76 (n = 7)	-
преднерестовая	0,73 – 0,76 (n = 6)	0,67 – 0,72 (n = 5)
нерест	0,76 – 0,80 (n = 48)	0,70 – 0,74 (n = 24)
посленерестовая	-	0,66 – 0,69 (n = 13)
самки		
покой	-	0,65 – 0,70 (n = 2)
преднерестовая	0,74 – 0,77 (n = 8)	0,66 – 0,70 (n = 6)
нерест	0,75 – 0,80 (n = 7)	0,69 – 0,72 (n = 104)
посленерестовая	-	0,70 – 0,74 (n = 5)

Согласно данным, представленным в таблице 4.5, относительная электрофоретическая подвижность альбумина сыворотки крови азовского бычка-кругляка варьировала в меньшей степени по сравнению с показателем у рыб, отловленных в прибрежье Севастополя. Подвижность альбуминовой фракции в ЭФ-спектре черноморских бычков весной существенно выше, чем летом.

Таблица 4.5 Электрофоретическая подвижность альбумина сыворотки крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в разные сезоны года

Сезон	Сывороточный альбумин Кэф (мин - макс)	
	Черное море	Азовское море
весна	0,75 – 0,80 (n = 72)	0,69 – 0,73 (n = 22)
лето	0,71 – 0,76 (n = 12)	0,70 – 0,73 (n = 119)
осень	-	0,69 – 0,73 (n = 22)

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о влиянии физиологического состояния рыб (возраст, стадия зрелости гонад), а также сезонных изменений параметров среды на ЭФ-подвижность альбумина.

ГЛАВА 5 ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ БЫЧКА-КРУГЛЯКА ИЗ АКВАТОРИЙ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

5.1 Состояние прооксидантно-антиоксидантной системы бычка-кругляка в условиях комплексного загрязнения акваторий Черного и Азовского морей

Активность антиоксидантных ферментов и содержание модифицированных форм белков являются удобными и информативными биомаркерами, определяющими физиологическое состояние организма в условиях хронического загрязнения водной среды. В связи с этим были исследованы активность антиоксидантных ферментов и содержание продуктов окисления белков в крови бычка-кругляка из бухт Черного и Азовского морей с разным уровнем антропогенной нагрузки и проведено сравнение показателей, полученных в начале 2000-х и 2010-е годы.

Для того, чтобы исключить влияние эколого-физиологических и сезонных факторов на прооксидантно-антиоксидантный статус организма рыб, сравнение исследуемых параметров проводили на нерестящихся самцах бычка-кругляка одной возрастной группы в единый сезон года.

Активность АО ферментов в крови бычка-кругляка из разных севастопольских бухт в 2003 и 2012 годах представлена в таблице 5.1. У рыб, отловленных в бухте Стрелецкой в 2003 г., активность СОД такая же как у особей из бухты Мартыновой, но достоверно ниже, чем у бычков из бухты Карантинной ($p \leq 0,05$). Активность ПЕР и ГР достоверно снижена ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ соответственно) в эритроцитах крови бычка-кругляка из бухты Мартыновой по сравнению с этими показателями у рыб из Карантинной. Активность ГТ у рыб из Карантинной и Мартыновой бухт достоверно не отличалась, тогда как у особей из бухты Стрелецкой была меньше по сравнению с параметрами рыб из Мартыновой ($p \leq 0,01$). Активность КАТ не имела достоверных различий. У рыб, отловленных

в 2012 г., активность СОД и КАТ в крови достоверно ниже у особей из бухты Стрелецкой по сравнению с рыбами из Мартыновой ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$ соответственно) и, в случае с СОД, у особей из Карантинной ($p \leq 0,05$). В противоположность этому, активность ПЕР в крови самцов бычка-кругляка из бухты Стрелецкой была достоверно ниже, чем у рыб из двух других акваторий ($p \leq 0,01$). Активность глутатионзависимых ферментов у рыб из трех бухт не отличалась (Таблица 5.1).

Анализ долговременных изменений ферментативной активности в крови бычка-кругляка из разных севастопольских бухт позволил заключить, что активность ферментов в крови рыб из трех бухт в более поздний период достоверно выше, или имеет тенденцию к увеличению по сравнению с соответствующими показателями бычков, отловленных в 2003 году. Отмеченная закономерность особенно выражена для КАТ, СОД и ГТ, активность которых достоверно выше у рыб из всех исследуемых акваторий в 2012 году. Вместе с тем повышение активности ПЕР ($p \leq 0,05$) установлено только в крови бычка из Стрелецкой бухты, а активности ГР ($p \leq 0,001$) – у особей из бухты Мартынова. Соответственно выше оказался и ИП ФАОА в крови рыб, исследованных в современный период, хотя тренд его остался прежним: бухта Стрелецкая → Мартынова → Карантинная (в порядке возрастания значений) (Таблица 5.1).

Таблица 5.1 Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, $M \pm m$) крови бычка-кругляка из бухт Севастополя с разным уровнем загрязнения

Фермент	Район		
	2	3	4
	Стрелецкая	Мартынова	Карантинная
	2003 г.		
	n = 7	n = 9	n = 23
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,46 ± 0,02	0,37±0,04	0,42 ± 0,02
СОД, усл. ед.	82,14 ± 13,70•	98,63 ± 20,30	158,33 ± 22,2

Продолжение таблицы 5.1

1	2	3	4
ПЕР, опт. ед.	11,97 ± 3,56	5,19 ± 1,66•	10,12 ± 1,02
ГР, нмоль НАДФН	3,85 ± 1,67	0,81 ± 0,18•	3,63 ± 1,01
ГТ, нмоль конъюгата	9,49 ± 1,93*	15,11 ± 1,26	16,45 ± 3,09
ИП ФАОА	107,91	120,11	188,95
	2012 г.		
	n = 27	n = 19	n = 16
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,64 ± 0,02*	1,19 ± 0,17	0,83 ± 0,17
СОД, усл. ед.	144,51 ± 16,81*•	280,48 ± 38,59	287,85 ± 37,18
ПЕР, опт. ед.	19,54 ± 0,82*•	8,42 ± 0,92	8,24 ± 0,77
ГР, нмоль НАДФН	4,50 ± 0,88	7,11 ± 1,17	5,79 ± 1,18
ГТ, нмоль конъюгата	37,11 ± 6,69	41,12 ± 9,32	42,45 ± 7,63
ИП ФАОА	206,30	338,32	345,16

Примечания: * – достоверность различий ($p \leq 0,05-0,001$) между активностью АО ферментов в эритроцитах крови рыб из бухты Мартынова и других районов; • – Карантинной и других районов; **жирным** шрифтом обозначены долговременные изменения ($p \leq 0,05-0,001$)

Таким образом, у бычка-кругляка из трех севастопольских бухт, также как у скорпены из Севастопольской бухты [125], обнаружена общая тенденция повышения активности антиоксидантных ферментов крови в современный период по сравнению с 2003 годом, которая в наибольшей степени проявляется для ферментов КАТ, СОД и ГТ.

Как можно видеть из представленных в таблице 5.2 данных, активность АО ферментов не имела достоверных отличий у рыб из двух районов Арабатского залива Азовского моря, отловленных в 2003 г. Однако ИП ФАОА был выше у бычков из района с. Семеновка. Образцы крови рыб, полученные в 2012 г., имели более четкие различия, что выражалось в достоверно более высоких значениях КАТ ($p \leq 0,01$) и ГР ($p \leq 0,05$) у рыб из района с. Семеновки, тогда как значение

ПЕР превалировало у бычков из района с. Мысовое. Достоверных отличий значений активности СОД и ГТ у рыб из двух акваторий не выявлено.

Такая же закономерность, как и в случае с черноморскими бычками, установлена для активности АО ферментов крови бычка-кругляка, отловленного в двух районах Азовского моря в 2003 г. по сравнению с 2011-2012 гг. (Таблица 5.2).

Таблица 5.2 Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, $M \pm m$) крови бычка-кругляка из двух районов юго-западной части Азовского моря с разным уровнем загрязнения

Фермент	Район			
	с. Семеновка n = 11	с. Мысовое n = 9	с. Семеновка n = 27	с. Мысовое n = 23
	2003 г.		2011-2012 гг.	
КАТ, мг H ₂ O ₂	0,88 ± 0,06	1,03 ± 0,15	2,49 ± 0,29	0,34 ± 0,02*
СОД, усл. ед.	262,20 ± 73,39	191,74 ± 49,89	527,36 ± 53,92	533,97 ± 38,69
ПЕР, опт. ед.	2,91 ± 0,64	4,66 ± 0,91	3,72 ± 0,68	7,67 ± 0,62*
ГР, нмоль НАДФН	7,59 ± 1,19	7,07 ± 1,5	13,63 ± 2,25	4,52 ± 0,84*
ГТ, нмоль конъюгата	17,69 ± 3,71	24,28 ± 7,78	27,14 ± 5,44	33,96 ± 5,68
ИП ФАОА	291,27	228,78	574,34	580,46

Примечания: * – достоверность различий ($p \leq 0,05-0,001$) между активностью АО ферментов в эритроцитах крови бычков из двух бухт; **жирным** шрифтом обозначены долговременные изменения ($p \leq 0,05-0,001$).

Активность СОД достоверно выше в крови рыб, отловленных в обеих акваториях в более поздний период, тогда как активность КАТ отличалась в крови бычков из двух районов. У рыб из побережья с. Семеновки наблюдали достоверное увеличение активности КАТ ($p \leq 0,001$) в последние годы, тогда как у бычков, из района с. Мысовое значение активности этого фермента достоверно

снижалось ($p \leq 0,001$). Активность ПЕР ($p \leq 0,05$) возросла у особей из района с. Мысовое, а ГР ($p \leq 0,01$) – у бычков, обитающих у с. Семеновка. Активность ГТ также проявляла тенденцию к увеличению, но различия в этом случае были недостоверны. Обращает на себя внимание возрастание более чем в 2 раза ИП ФАОА в крови рыб в 2012 г. по сравнению с этим показателем рыб в 2003 г.

Содержание продуктов окисления белков в сыворотке крови бычка-кругляка из бухт Черного и Азовского морей в разные периоды времени приведено в таблицах 5.3 и 5.4.

Таблица 5.3 Содержание продуктов окисления белков (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$) в сыворотке крови бычка-кругляка из бухт Севастополя с разным уровнем загрязнения

Район	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ
	альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
	2003-2005 гг.				
Стрелецкая n = 5	7,12 ± 1,14	9,35 ± 0,71•	6,59 ± 0,99•	0,93 ± 0,18	23,99
Мартынова n = 4	5,20 ± 1,01	6,77 ± 1,53	3,95 ± 0,85	0,50 ± 0,1	16,42
Карантинная n = 6	4,65 ± 0,74	6,36 ± 1,04	3,93 ± 0,49	0,76 ± 0,06	15,70
	2012 г.				
Стрелецкая n = 7	7,01 ± 0,23*	7,94 ± 0,31*	4,67 ± 0,18*	1,14 ± 0,14	20,76
Мартынова n = 9	10,73 ± 0,76	11,7 ± 0,77	7,12 ± 0,54	0,92 ± 0,17	30,47
Карантинная n = 10	7,17 ± 0,38*	7,80 ± 0,37*	4,73 ± 0,26*	0,71 ± 0,14	20,41

Примечания: * – достоверность различий ($p \leq 0,05-0,01$) между содержанием продуктов окисления белков в сыворотке крови рыб из бухты Мартыновой и других районов; • – Карантинной и других районов; **жирным** шрифтом обозначены долговременные изменения ($p \leq 0,05-0,001$)

Как можно видеть, уровень окисленных белков в сыворотке крови бычков из Карантинной и Мартыновой бухт в уловах 2003 г. достоверно не отличался и был ниже, чем у рыб из Стрелецкой. Различия достоверны между содержанием кетопроизводных нейтрального ($p \leq 0,05$) и альдегидопроизводными основного ($p \leq 0,05$) характера у рыб из бухт Стрелецкой и Карантинной. В более современный период содержание продуктов нейтрального ($p \leq 0,01$) и альдегидопроизводных основного ($p \leq 0,01$) характера достоверно выше в сыворотке крови бычков из бухты Мартынова по сравнению с таковыми у рыб из двух других бухт.

Уровень окисленных белков в сыворотке крови рыб из бухты Стрелецкой почти не изменился за 10 лет. В то же время произошло существенное увеличение содержания окисленных форм белков в сыворотке крови бычков из бухты Мартынова в 2012 г. Такая же тенденция, но выраженная в меньшей степени, характерна для рыб из бухты Карантинной.

Содержание модифицированных белков в сыворотке крови азовских бычков из уловов 2003-2005 гг. не отличалось у особей из двух акваторий. В уловах 2011-2012 гг. наблюдали достоверное увеличение содержания продуктов окисления белков в сыворотке крови рыб из района с. Мысовое по сравнению с таковыми у особей из второй акватории. Различия достоверны для альдегидопроизводных нейтрального характера ($p \leq 0,01$).

Так же, как и в случае с черноморскими бычками, содержание окисленных белков в сыворотке крови бычков из обеих акваторий Арабатского залива достоверно возрастает в более поздний период за счет компонентов нейтрального характера, тогда как уровень продуктов основного характера остается неизменным (Таблица 5.4).

Таблица 5.4 Содержание продуктов окисления белков (опт. ед./мл сыворотки, $M \pm m$) в сыворотке крови бычка-кругляка из двух районов юго-западной части Азовского моря с разным уровнем загрязнения

Район	продукты нейтрального характера		продукты основного характера		ПО ОМБ
	альдегидные 346 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
	2003-2005 гг.				
с. Семеновка n = 5	3,00 ± 0,71	3,92 ± 0,80	2,97 ± 0,63	0,48 ± 0,11	10,37
с. Мысовое n = 11	3,69 ± 0,46	4,62 ± 0,51	3,19 ± 0,38	0,52 ± 0,13	12,02
	2011-2012 гг.				
с. Семеновка n = 7	5,10 ± 0,28	6,87 ± 0,27	3,33 ± 0,32	0,60 ± 0,13	15,90
с. Мысовое n = 7	6,97 ± 0,72*	9,0 ± 1,02	4,32 ± 0,57	0,58 ± 0,13	20,87

Примечания: * - достоверность различий ($p \leq 0,05$) между содержанием окисленных форм белков в сыворотке крови бычков из двух бухт; **жирным шрифтом** обозначены долговременные изменения ($p \leq 0,05-0,01$)

На основании полученных значений ИП ФАОА и ПО ОМБ нами были рассчитаны КПАР для рыб из каждой исследуемой бухты в Черном (Рисунок 5.1 А) и Азовском (Рисунок 5.1 Б) морях в оба периода.

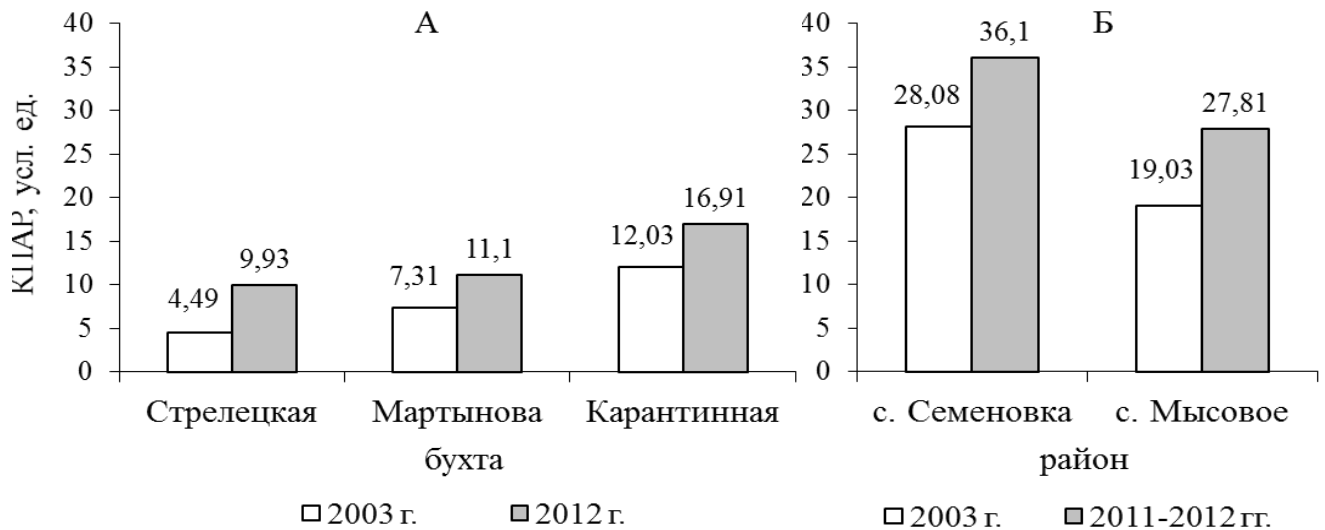


Рисунок 5.1 Коэффициент прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови бычка-кругляка из акваторий Черного (А) и Азовского (Б) морей с разным уровнем загрязнения

Значения КПАР для рыб из трех севастопольских бухт в порядке возрастания можно расположить следующим образом: Стрелецкая → Мартынова → Карантинная, что справедливо для обоих периодов. В то же время величина КПАР у рыб из района с. Семеновка была выше, чем у бычков, обитавших у с. Мысовое в 2003 г. и в современный период. Анализ долговременных изменений значений КПАР в крови рыб из исследуемых акваторий Черного и Азовского морей показал его увеличение в 2010-е годы по сравнению с началом 2000-х. Выявленная особенность может быть обусловлена преобладанием прооксидантных процессов над антиоксидантными и увеличением этой разницы в более поздний период.

5.2 Влияние содержания токсичных элементов в мышцах рыб на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из прибрежья Севастополя (Черное море)

В настоящее время, в условиях глобального антропогенного воздействия на гидросферу, мониторинг загрязнения водной среды токсичными элементами (ТЭ) приобретает особое значение, что делает необходимым поиск биомаркеров,

чувствительных к этой группе химических загрязнителей и адекватно отражающих состояние организма и среды его обитания.

В связи с этим, интерес представляло изучить влияние ТЭ в мышцах рыб на активность АО ферментов эритроцитов крови и процессы окислительной модификации сывороточных белков бычка-кругляка из побережья Севастополя в разные сезоны года.

Как можно видеть из таблицы 5.5, содержание ТЭ в мышечной ткани бычка-кругляка отличается по сезонам года, но не превышает ПДК.

Таблица 5.5 Сезонная динамика содержания токсичных элементов (мг/кг) в мышечной ткани бычка-кругляка из Черного моря [88]

Сезон	Cu	Pb	Cd	Zn	As	Hg	Σ ТЭ
Зима	0,65 ± 0,08	0,035 ± 0,004	<0,01	3,15 ± 0,6	1,0 ± 0,07	0,048 ± 0,001	4,89
Весна	0,60 ± 0,01	0,07 ± 0,002*	-	3,48 ± 0,2	0,69 ± 0,01*	0,04 ± 0,004	4,88
Лето	0,51 ± 0,01 [■]	0,08 ± 0,004* [■]	-	3,42 ± 0,1	0,49 ± 0,01* [■]	0,05 ± 0,001 [■]	4,55
Осень	0,79 ± 0,03 ^{■•}	0,22 ± 0,01* ^{■•}	0,003 ± 0,0006	3,0 ± 0,3	1,5 ± 0,1* ^{■•}	0,06 ± 0,002* ^{■•}	5,57

Примечания: * – достоверность различий ($p \leq 0,05-0,001$) с зимним сезоном; [■] – с весенним; [•] – с летним; Σ ТЭ – суммарный показатель токсичных элементов в мышцах рыб

Концентрация Cu, As и Hg в мышцах бычка-кругляка ниже в весенне-летний период по сравнению с осенне-зимним. Уровень Pb в мышечной ткани кругляка растет в ряду зима → весна → лето → осень ($p \leq 0,05$). Достоверных различий в содержании Zn по сезонам года не выявлено. Максимальное значение суммарного показателя ТЭ (Σ ТЭ) у бычка-кругляка зафиксировано осенью, хотя в целом этот показатель незначительно изменяется в течение года.

На основании представленных в таблице 5.5 данных исследуемые элементы по уровню накопления в мышцах бычка-кругляка можно расположить следующим образом: $Zn > As > Cu > Pb > Hg > Cd$, что согласуется с данными, полученными на других массовых черноморских видах рыб [96].

В дальнейшем интерес представляло выявить корреляционную зависимость между содержанием токсичных элементов в мышцах бычка-кругляка и активностью АО ферментов крови (Таблица 5.6), а также процессами перекисного окисления сывороточных белков (Таблица 5.7).

Таблица 5.6 Коэффициенты корреляции между показателями активности антиоксидантных ферментов крови и содержанием токсичных элементов в мышечной ткани бычка-кругляка

Фермент	Cu	Pb	Zn	As	Hg	Σ ТЭ
КАТ	-0,17	0,60	0,85	-0,44	-0,87	0,16
СОД	-0,54	0,87	0,99	-0,76	-0,60	-0,24
ПЕР	0,50	-0,84	-0,98	0,72	0,64	0,19
ГР	0,09	0,37	0,69	-0,19	-0,97	0,42
ГТ	0,22	0,24	0,59	-0,06	-0,99	0,53

Корреляционный анализ показал определенную зависимость между активностью АО ферментов и содержанием токсичных элементов в тканях бычка-кругляка. Так, сильная и значительная связь выявлена между содержанием всех элементов и активностью СОД и ПЕР, для которых коэффициенты корреляции находились в пределах 0,50-0,99. Сильная отрицательная зависимость установлена между активностью ГР ($r = -0,97$) и ГТ ($r = -0,99$) и концентрацией Hg в тканях кругляка. С Zn у этих ферментов выявлена значительная положительная связь ($r = 0,69$; $0,59$ соответственно). В остальных случаях корреляционная зависимость была слабой, за исключением ГР и Pb ($r = 0,37$). Сильная и значительная связь установлена между активностью КАТ и концентрацией Hg, Zn и Pb, тогда как между уровнем Cu и As связь слабая ($r = -0,17$) и умеренная ($r = -0,44$) соответственно.

Для большинства АО ферментов крови у кругляка установлена слабая (КАТ, СОД и ПЕР) и умеренная (ГР) связь с показателем суммарного содержания ТЭ в его мышцах, за исключением активности ГТ ($r = 0,53$, значительная).

Таблица 5.7 Коэффициенты корреляции между содержанием окисленных форм белков в сыворотке крови и уровнем токсичных элементов в мышечной ткани бычка-кругляка

Длина волны, нм	Cu	Pb	Zn	As	Hg	Σ ТЭ
346	0,58	0,96	-0,56	0,62	0,87	0,69
370	0,68	0,99	-0,55	0,68	0,79	0,80
430	0,52	0,96	-0,38	0,52	0,72	0,67
530	-0,16	0,41	0,46	-0,23	-0,04	0,03

Тесная зависимость установлена между содержанием продуктов окисления сывороточных белков и концентрациями ТЭ в тканях рыб, что наиболее выражено для продуктов нейтрального и альдегидпроизводных основного характера (D 346, 370 и 430 соответственно). Значительная положительная связь выявлена между содержанием вышеперечисленных компонентов и концентрацией Cu ($r = 0,52-0,68$) и As ($r = 0,52-0,68$), сильная положительная - с содержанием Hg ($r = 0,72-0,87$) и Pb ($r = 0,96-0,99$). Корреляция между концентрациями Zn и продуктами нейтрального характера значительная отрицательная ($r = (-0,55)-(-0,65)$), с альдегидпроизводными основного характера – умеренная отрицательная ($r = -0,38$). Для кетопроизводных основного характера (D 530) отмечена противоположная тенденция. Слабая отрицательная связь выявлена у этой группы соединений со всеми элементами, кроме Pb и Zn (умеренная положительная).

Сильная и значительная положительная связь установлена между содержанием всех продуктов окислительной модификации сывороточных белков и показателем суммарного содержания ТЭ в мышцах бычка-кругляка (0,69-0,80), за исключением кетопроизводных основного характера ($r = 0,03$).

Таким образом, нами была установлена определенная зависимость между содержанием ТЭ в мышцах бычка-кругляка и реакциями биохимических параметров крови.

5.3 Влияние комплексного загрязнения среды обитания на электрофоретические характеристики белков сыворотки крови бычка-кругляка из акваторий Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения

Метод электрофоретического разделения белков различных тканей живых организмов широко применяется для решения генетических и филогенетических проблем, выявления маркеров патологических состояний и многих других задач [71; 203; 229]. В последнее время он все чаще стал использоваться в экотоксикологии для оценки влияния качества среды на физиолого-биохимический статус ее обитателей. Прежде всего, это касается выявления последствий негативных влияний на организм, в том числе связанных с антропогенной деятельностью [213; 309]. Известно, что белки сыворотки крови являются компонентами многофункциональной системы, отражающей состояние организма и его изменения, возникающие под действием различных факторов среды обитания. Так, было показано, что в результате инфекций и паразитарной инвазии в сыворотке крови рыб происходят качественные и количественные изменения соотношений белковых фракций [71; 229]. Изменение белкового спектра сыворотки крови рыб было также установлено в экспериментальных и природных условиях, при действии отдельных токсикантов или их смеси и комплексном загрязнении среды обитания соответственно [17; 106; 213; 309].

В связи с этим интересным представлялось изучить электрофоретические характеристики белков и статистические показатели числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови бычка-кругляка из бухт Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения.

Сравнительный анализ белковых спектров сыворотки крови бычка-кругляка из трех севастопольских бухт показал изменение электрофоретической подвижности фракций и их перераспределение внутри белковых зон, особенно в постальбуминовой. Распределение фракций в ней имело больше сходства в ЭФ-спектрах рыб из бухт Стрелецкой и Мартыновой, которые отличались высоким

содержанием диффузных полос по сравнению с параметрами бычков из бухты Карантинной. Количество белковых фракций в «стандартных» ЭФ-спектрах одинаково для рыб из бухт Стрелецкой и Мартыновой (19) и на одну полосу больше в ЭФ-спектре рыб из третьей акватории (Рисунок 5.2, Таблица 5.8).

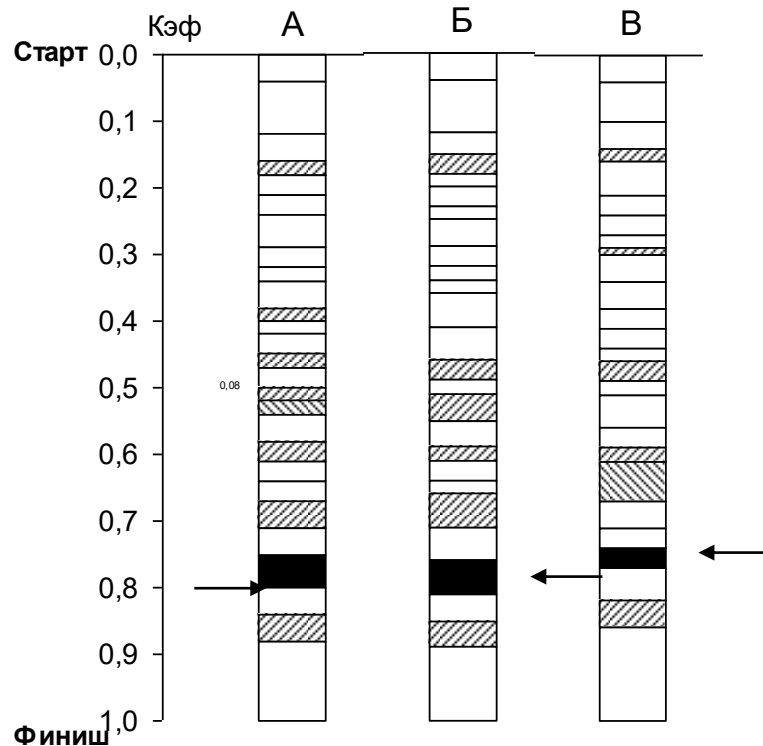


Рисунок 5.2 «Стандартные» ЭФ-спектры белков сыворотки крови бычка-кругляка из бухт Стрелецкой (А), Мартыновой (Б) и Карантинной (В) в районе Севастополя. (→) – альбумин; Кэф – коэффициент относительной электрофоретической подвижности; Финиш – свидетель (Бромфеноловый синий), принятый за 1,0

Снижение нижних и верхних пределов числа фракций в ЭФ-спектрах было отмечено у бычка-кругляка из бухты Стрелецкой по сравнению с рыбами из двух других акваторий. Среднее значение количества фракций в ЭФ-спектрах бычков из трех бухт достоверно не отличалось. Коэффициент вариации изменялся незначительно и максимален у бычков из бухты Карантинной. Пределы электрофоретической подвижности снижались в ряду: Стрелецкая→Карантинная

→Мартынова. Подвижность альбуминовой фракции находилась в пределах Кэф 0,74-0,81.

Таблица 5.8 Статистические показатели числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови бычка-кругляка из трех севастопольских бухт

Параметры	Бухта		
	Стрелецкая	Мартынова	Карантинная
Количество особей, n	39	7	38
Пределы числа фракций в ЭФ-спектрах	7-20 (13)	11-18 (7)	7-22 (15)
Среднее число фракций в ЭФ-спектрах, $M \pm m$	$15,2 \pm 0,39$	$14,8 \pm 0,9$	$14,6 \pm 0,5$
Количество вариантов ЭФ-спектров по числу фракций в них	11	7	13
Число «редких» фракций, %	34	23	35
Коэффициент вариации, CV, %	16,1	16,08	20,9
Пределы ЭФ-подвижности	0,00-1,33	0,00-1,07	0,00-1,13
Число фракций в «стандартном» ЭФ-спектре, в том числе по зонам:	19	19	20
Преальбуминовая (I)	1	1	1
альбуминовая (II)	1	1	1
Постальбуминовая (III)	9	8	10
Трансферриновая (IV)	3	4	3
Посттрансферриновая (V)	3	3	3
предстартовая (VI)	2	2	2
Кэф альбумина	0,75-0,80	0,76-0,81	0,74-0,77

«Стандартные» ЭФ-спектры белков сыворотки крови бычка-кругляка из двух районов юго-западной части Азовского моря представлены на рисунке 5.3.

Результаты исследований показали, что «стандартные» ЭФ-спектры бычков, обитающих в двух районах Арабатского залива, отличаются незначительно. Количество белковых компонентов меньше в «стандартном» ЭФ-спектре у бычков из района с. Мысовое за счет отсутствия полосы в постальбуминовой области.

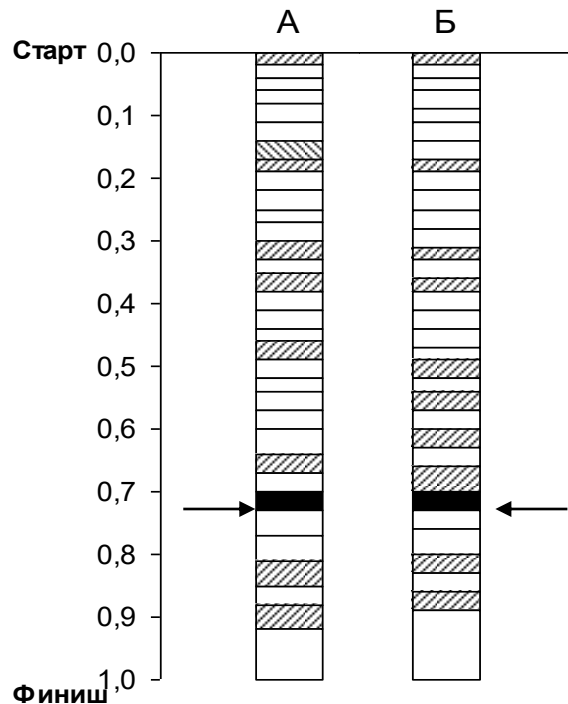


Рисунок 5.3 «Стандартные» ЭФ-спектры белков сыворотки крови бычка-кругляка из района с. Семеновка (А) и района с. Мысовое (Б) юго-западной части Азовского моря. (→) – альбумин; Кэф – коэффициент относительной электрофоретической подвижности; Финиш – свидетель (Бромфеноловый синий), принятый за 1,0

В других зонах количество фракций одинаково в ЭФ-спектрах бычков из обоих районов (Рисунок 5.3, Таблица 5.9).

В то же время анализ статистических показателей числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови показал наличие некоторых расхождений у рыб из двух акваторий (Таблица 5.9).

Таблица 5.9 Статистические показатели числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови бычка-кругляка из двух районов юго-западной части Азовского моря

Параметры	Район	
	с. Семеновка	с. Мысовое
Количество, n	91	79
Пределы числа фракций в ЭФ-спектрах	9-29 (20)	8-24 (16)
Среднее число фракций в ЭФ-спектрах, $M \pm m$	$19,0 \pm 0,36$	$16,7 \pm 0,37^*$
Количество вариантов ЭФ-спектров по числу фракций в них	18	16
Число «редких» фракций, %	14	18
Коэффициент вариации, CV, %	18,3	20
Пределы ЭФ-подвижности	0,00-1,14	0,00-1,40
Число фракций в «стандартном» ЭФ-спектре, в том числе по зонам:	24	23
преальбуминовая (I)	3	3
альбуминовая (II)	1	1
постальбуминовая (III)	9	8
трансферриновая (IV)	4	4
посттрансферриновая (V)	3	3
предстартовая (VI)	4	4
Кэф альбумина	0,70-0,73	0,70-0,73

Снижение нижних и верхних пределов числа фракций, достоверное сокращение ($p \leq 0,001$) среднего количества полос в ЭФ-спектрах, а также уменьшение количества вариантов ЭФ-спектров по числу фракций в них были отмечены у рыб из района с. Мысовое по сравнению с таковыми у бычков из

прибрежья с. Семеновка. Коэффициент вариации и число «редких» фракций изменяются незначительно. Пределы ЭФ-подвижности существенно выше в ЭФ-спектрах бычков из прибрежья с. Мысовое. Подвижность альбуминовой фракции одинакова в ЭФ-спектрах рыб из обоих районов.

В наших исследованиях содержание «редких» белковых фракций в ЭФ-спектрах черноморских бычков составило 38 %, из них на долю преальбуминов приходится 89 %. У азовских бычков количество «редких» компонентов в ЭФ-спектрах было равным 20 %, из которых 69 % – преальбумины.

В связи с этим, интерес представляло изучить фракционный состав преальбуминов сыворотки крови бычка-кругляка из акваторий Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения.

Результаты исследований показали существенную гетерогенность преальбуминов сыворотки крови бычка-кругляка, обитающего в бухтах Черного и Азовского морей. Число фракций преальбуминов в сыворотке крови черноморских бычков варьировало в пределах 4-6, а их распределение и встречаемость различались у особей из трех бухт (Рисунок 5.4).

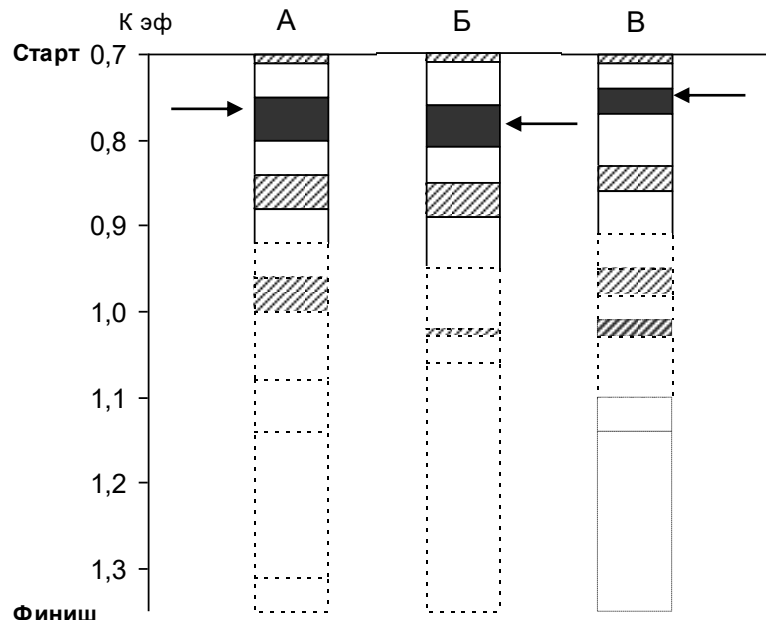


Рисунок 5.4 ЭФ-спектры преальбуминов сыворотки крови бычка-кругляка из бухт Стрелецкой (А), Мартыновой (Б) и Карантинной (В) в районе

Севастополя. Пунктирной линией обозначены фракции, не вошедшие в стандартные ЭФ-спектры (частота встречаемости ниже 50 %); (→) – альбумин

Как можно видеть, спектры преальбуминов сыворотки крови имеют сходство у рыб из Стрелецкой и Карантинной бухт по числу фракций (6), тогда как у рыб из бухты Мартынова количество компонентов в этой области сокращено до 4. Вместе с тем распределение преальбуминовых полос на электрофореграммах сыворотки крови рыб из трех исследуемых черноморских бухт различается. Так, у особей из бухты Стрелецкой отсутствует компонент с $K_{эф} = 1,01-1,03$, но обнаружена фракция с высокой электрофоретической подвижностью $K_{эф} = 1,31$. В ЭФ-спектре сыворотки крови бычка из бухты Мартынова отсутствует фракция преальбумина с $K_{эф} = 0,96-1,00$, также как и компоненты с высокой подвижностью ($K_{эф} > 1,05$), обнаруженные в сыворотке крови рыб из двух других бухт. В сыворотке крови бычков из бухты Карантинной присутствуют все фракции, которые идентифицированы у рыб из двух других бухт, за исключением компонента с $K_{эф} = 1,31$.

Таким образом, в сыворотке крови рыб из Карантинной бухты отмечены фракции преальбуминов, которые присутствуют у особей, отловленных как в бухте Мартынова, так и в бухте Стрелецкой, за исключением компонента с высокой ЭФ-подвижностью ($K_{эф} = 1,31$), найденного только у рыб из Стрелецкой бухты.

ЭФ-спектры преальбуминов сыворотки крови бычка-кругляка из двух районов Арабатского залива Азовского моря приведены на рисунке 5.5.

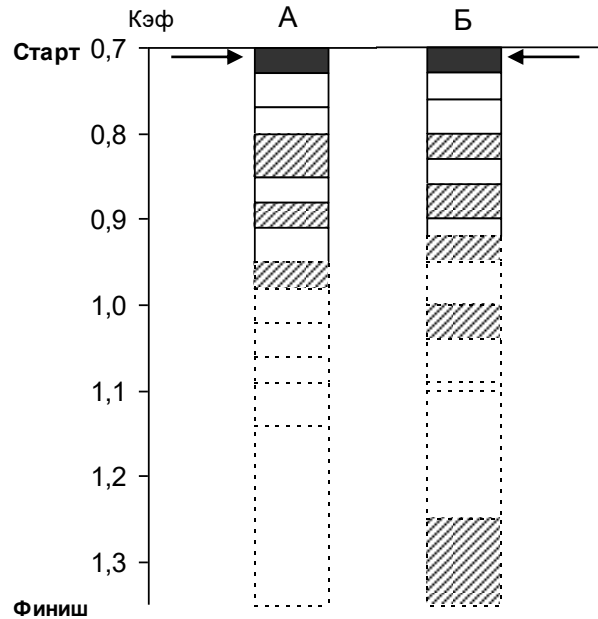


Рисунок 5.5 ЭФ-спектры преальбуминов сыворотки крови бычка-кругляка из района с. Семеновка (А) и района с. Мысовое (Б) юго-западной части Азовского моря. Пунктирной линией обозначены фракции, не вошедшие в стандартные ЭФ-спектры (частота встречаемости ниже 50 %); (→) – альбумин

Число фракций преальбуминов в сыворотке крови бычков из Азовского моря, отловленных в двух акваториях, составляет 8, что превышает соответствующие значения рыб из Черного моря. Вместе с тем следует отметить, что при сходстве спектров преальбуминов сыворотки крови рыб из обеих акваторий, Кэф наиболее быстрой фракции рыб из прибрежных вод с. Мысовое значительно выше соответствующего показателя бычков из акватории с. Семеновка.

Таким образом, в результате исследования белкового состава сыворотки крови рыб из бухт Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения, обнаружены различия в распределении, числе, соотношении и вариации показателей, что в большей степени выражено в ЭФ-спектрах бычков из трех севастопольских бухт.

ГЛАВА 6 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биохимический статус любого организма определяется генетическими особенностями вида и специфическими метаболическими адаптациями к конкретным условиям среды. Изменение физико-химических свойств природных вод при антропогенном воздействии приводит к реорганизации метаболизма, что влияет на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крови рыб. В то же время состояние АО ферментативной системы зависит от многих аспектов физиологического состояния животных, в частности от возраста.

При старении, наряду с общим снижением обменных процессов в организме, повышается чувствительность многих ферментов, в том числе антиоксидантных [193], к металлкатализируемому окислению. Это приводит к накоплению в тканях их окисленных неактивных форм, снижению АО активности и, как следствие, смещению прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону процессов СРО биомолекул [36].

Так, у пресноводных и морских видов рыб установлено снижение активности СОД и КАТ в печени и эритроцитах крови более старших особей [192]. Активность большинства АО ферментов снижалась в эритроцитах крови морского ерша, налима, султанки, мерланга и спикары старших возрастных групп [162]. При этом общее содержание модифицированных форм белков в сыворотке крови морского ерша и мерланга выше у старых рыб по сравнению с молодыми [121]. Подобная тенденция отмечена для *Nothobranchius rachovii*, максимальный срок жизни которой составляет 8,5 месяца. Активность КАТ, ГП, Мп-СОД и Cu, Zn-СОД снижалась, а уровень ПОЛ и ПОБ увеличивался в гомогенатах тканей 7-месячных рыб по сравнению с показателями у 1- и 4-месячных особей [164].

В наших исследованиях активность КАТ, ГР у черноморских бычков и СОД, ГР у азовских достоверно снижалась в эритроцитах крови 3-летних рыб по сравнению с 1-2-годовиками (Таблица 3.3). Содержание окисленных форм белков возрастало в сыворотке крови рыб старших возрастных групп из прибрежной зоны Севастополя (Таблица 3.4).

У бычков из Арабатского залива Азовского моря возрастные изменения содержания окисленных форм белков выражены в меньшей степени, хотя у 3-летних рыб значение КПАР, как и у черноморских бычков, в 2 раза ниже по сравнению с 1-2 годовалыми рыбами (Рисунок 3.2).

В то же время в литературе показаны снижение АО активности и интенсификация прооксидантных реакций в организме старых животных при действии неблагоприятных факторов среды [40; 58]. В наших исследованиях установлено значительное преобладание АО реакций над окислительными в крови соответствующих возрастных групп азовских бычков по сравнению с рыбами из побережья Севастополя (Рисунок 3.2). При этом максимальные значения общей АО активности (ИП ФАОА) были выявлены у бычков из двух морей в возрасте 1-2 лет (Таблица 3.3), что совпадает с периодом полового созревания у этого вида [50]. Увеличение АО активности клеток и тканей при наступлении половой зрелости было показано для рыб [253; 261] и других животных [145].

Отдельного обсуждения заслуживает увеличение активности КАТ и ГТ в эритроцитах крови черноморских бычков в возрасте 4 и 5 лет, что может являться компенсаторной реакцией рыб старших возрастных групп на повышение интенсивности процессов СРО сывороточных белков в условиях хронического загрязнения севастопольских акваторий (Таблица 3.3, Таблица 3.4). Аналогичная зависимость была показана в работах других авторов на рыбах и млекопитающих [121; 131].

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. активность АО ферментов крови бычка-кругляка из севастопольских акваторий (КАТ, ГР) и юго-западной части Азовского моря (СОД, ГР) снижалась в 1,5-2 раза у 3-х годовалых рыб по сравнению с 1-2-х летними. Содержание окисленных форм белков увеличено в сыворотке крови рыб старших возрастных групп из прибрежной зоны Севастополя;

2. увеличение активности КАТ ($p \leq 0,05$) и ГТ ($p \leq 0,05$) в эритроцитах крови черноморских бычков в возрасте 4-5 лет может являться компенсаторной реакцией стареющего организма на повышение интенсивности процессов СРО сывороточных белков в условиях хронического загрязнения севавтопольских акваторий.

АОС во многом связана с гормональным статусом рыб, в связи с чем изучали половые различия прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка.

Литературные данные, свидетельствующие о наличии межполовых различий активности АО ферментов и показателей ПОЛ в организме рыб, противоречивы, и зависят от видовых особенностей [104; 114], стадии репродуктивного цикла [6; 4], исследуемой ткани [104] и половой избирательности к действию отдельных токсикантов [286].

У полосатой камбалы из Амурского залива активность КАТ, ГТ, а также содержание восстановленного глутатиона и уровень ПОЛ в печени самок и самцов не имели достоверных различий в течение года, за исключением увеличения активности СОД у самцов с июля по декабрь [6]. Исследования активности АО ферментов в эритроцитах крови морского налима, султанки, мерланга, спикары, ставриды и морского ерша не показали межполовых различий, за исключением достоверно более высоких значений активности КАТ у самок мерланга и СОД у самок ерша по сравнению с таковой у самцов этих видов рыб [114]. Содержание продуктов окисления белков в сыворотке разнополых особей перечисленных выше рыб также не отличалось, проявляя тенденцию к увеличению у самцов [121].

В наших исследованиях установлены снижение активности КАТ, СОД (Таблица 3.5) и увеличение содержания кетопроизводных нейтрального и альдегидопроизводных основного характера в крови самцов рыб по сравнению с соответствующими показателями самок бычка-кругляка из севавтопольских акваторий (Таблица 3.6). Согласованная работа этих ферментов (КАТ и СОД) обеспечивает поддержание концентрации АФК на безопасном для организма

уровне [101], тогда как снижение их активности в эритроцитах крови бычка-кругляка из севастопольских акваторий привело к усилению процессов СРО белков сыворотки крови самцов рыб (Таблица 3.6).

Анализ исследованных маркеров не показал выраженных половых различий у рыб из Арабатского залива Азовского моря (Таблица 3.5, Таблица 3.6). При этом антиоксидантные реакции преобладали над прооксидантными в крови самок и самцов азовского бычка-кругляка по сравнению с таковыми у рыб из побережья Севастополя, о чем свидетельствуют значения КПАР, представленные на рисунке 3.3.

В то же время в литературе показана избирательность ответной реакции биомаркеров самок и самцов рыб на действие отдельных ксенобиотиков в экспериментальных условиях [286] и комплексное загрязнение среды обитания [34].

Таким образом, выявленные у черноморского бычка-кругляка межполовые различия могут быть связаны как с особенностями накопления ксенобиотиков и избирательностью ответных реакций в тканях рыб разного пола, так и спецификой нерестового поведения у самцов этого вида в условиях хронического загрязнения севастопольских бухт, что подтвердили исследования прооксидантно-антиоксидантной системы крови рыб в разные *периоды репродуктивного цикла*.

Активность большинства АО ферментов эритроцитов крови самок и самцов черноморского бычка-кругляка возрастала в период созревания гонад (Таблица 3.7) по сравнению с соответствующими показателями рыб в период покоя, что связано с интенсификацией обменных процессов, обусловленных повышением температуры воды весной, а также участием ферментов АОС в метаболизме физиологически активных веществ в преднерестовый период. Высокая активность ГТ и КАТ в печени полосатой камбалы [6] и ГТ в печени бельдюги [278] была отмечена в период созревания половых желез.

В то же время максимальные значения ИП ФАОА крови рыб из двух морей были установлены во время нереста (Таблица 3.7, Таблица 3.8). Исключением

явились самцы бычка-кругляка из севастопольских акваторий, активность СОД, КАТ и ГТ в крови которых была достоверно ниже таковой у самок (Таблица 3.7), а значение КПАР свидетельствовало о накоплении модифицированных форм белков в сыворотке их крови (Рисунок 3.4 А). Активный протеолиз последних приводит к образованию среднемолекулярных олигопептидов близких по строению к регуляторным, что негативно влияет на метаболизм и функции клеток [45].

Нерест у кругляка сильно растянут, он длится с конца апреля по сентябрь. Постройкой, охраной и аэрацией гнезда вплоть до самого выклева молоди занимаются только самцы. В этот период они не питаются и сильно теряют в массе [79; 116]. Забота о кладке с икрой на протяжении длительного времени требует траты значительных пластических и энергетических ресурсов и, как следствие, соответствующей реорганизации метаболизма. Известно, что в нерестовый период жировые запасы печени самки идут на повторное созревание ооцитов, тогда как у самцов они помогают пережить вынужденный голод [146]. Особенности физиологии нереста у самок и самцов бычка-кругляка представлены на рисунке 6.1.

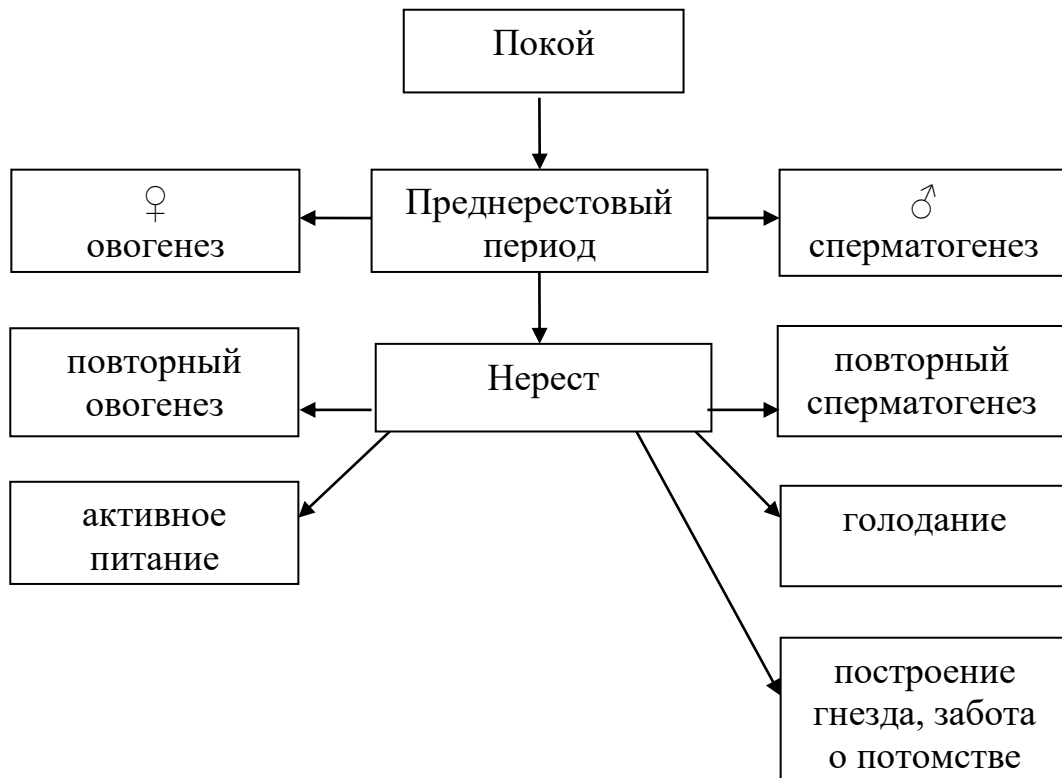


Рисунок 6.1 Особенности физиологии нереста у самок и самцов бычка-кругляка

Изучение общих механизмов стресс-синдрома, обозначенного Г. Селье как «общий адаптационный синдром», показало активацию адренергической и гипофизарно-адреналовой систем организма на действие любого достаточно сильного фактора среды. В результате происходит мобилизация энергетического обмена [74] и усиление функции АОС [28].

Вероятно, высокое содержание загрязнителей в воде севастопольских бухт, требующих постоянных энергетических трат на их детоксикацию, способствовало истощению защитных ресурсов организма самцов черноморских бычков на фоне стрессовой ситуации – нереста [72; 282].

Для бычков из прибрежной зоны Севастополя действие хронического загрязнения выражается и в замедлении их темпов роста, когда в результате постоянных энергетических затрат на обезвреживание ксенобиотиков, траты энергии на генеративный обмен превалируют над тратами энергии на процессы роста [148]. Согласно данным, представленным в таблице 2.1, самки и самцы

азовского бычка-кругляка превосходят черноморских рыб по всем размерно-массовым характеристикам, ГСИ и упитанности, при этом опережение в размерах прослеживается с первых лет жизни.

После окончания нереста активность СОД, ПЕР и ГТ достоверно снижается у самок рыб из Арабатского залива, тогда как у самцов эта тенденция отмечена только для ГТ (Таблица 3.8). ПО ОМБ несколько возрастает, как следствие значение КПАР у самок снижается почти в 2,5 раза, а у самцов в 1,3 (Рисунок 3.4 Б). Снижение активности ГП и ГР в 1,6 и 1,8 раза соответственно и увеличение содержания глутатиона в 1,9 раз были отмечены в гонадах самок камбалы-калкан после нереста. У самцов достоверных отличий по этим показателям в нерестовый и посленерестовый периоды не выявлено [31].

Отдельного обсуждения заслуживает увеличение активности ГТ в эритроцитах самок бычка-кругляка из севастопольских акваторий (Таблица 3.7), а также самок и самцов рыб из юго-западной части Азовского моря во время нереста (Таблица 3.8). Наряду с детоксикацией органических соединений, количество которых увеличивается в прибрежных водах в теплое время года, этот фермент участвует в метаболизме стероидных гормонов, что способствует повышению его активности не только в преднерестовый период, как было отмечено для единовременно нерестующих видов [6; 278], но, вероятно, и во время нереста у видов с порционным икрометанием (бычок-кругляк) [42].

Таким образом, установлено изменение показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из двух морей в разные периоды репродуктивной активности, а также модифицирующее влияние комплексного загрязнения севастопольских акваторий на АОС крови самцов бычка-кругляка в период нереста.

В то же время состояние показателей прооксидантно-антиоксидантной системы может зависеть от сезонных изменений гидролого-гидрохимических характеристик природных вод (концентрация кислорода, температура, соленость, рН), что известно из литературы [3; 70; 87; 132; 179; 269; 296].

Колебания *концентрации кислорода* в воде способны стимулировать образование АФК и, в свою очередь, приводить к изменению активности АО ферментов [269]. На примере низших позвоночных, толерантных к низкому содержанию кислорода в среде, установлено, что реоксигенация тканей после состояния гипоксии/ аноксии сопровождается значительной индукцией процессов СРО, что может вызывать больший стресс чем сам период гипоксии [179].

Другим важным фактором способным существенно влиять на ферментативную активность является *температура воды*. Показано увеличение активности отдельных ферментов при повышении температуры в среде обитания [87; 296].

На примере гобуши и лаврака (*Dicentrarchus labrax*) в природных и экспериментальных условиях по опреснению, соответственно, было показано влияние *солености воды* на состояние показателей ферментативной АОС [3; 268].

Перестройка гемоглобиновой системы бычка-кругляка в сторону увеличения содержания компонента, обладающего высоким сродством к кислороду и повышенной чувствительностью к рН, установлена в условиях экспериментальной гипоксии (1,7-1,8 мг О₂/л). Закисление инкубационной среды (рН 8,3 → 7,5) приводит к снижению насыщения гемоглобина кислородом на $12,8 \pm 1,4$ % (эффект Рута) [132]. Таким образом, более низкие *значения рН* воды Азовского моря (7,3 против 8,3 в Черном море) могут также влиять на процессы насыщения гемоглобина кислородом и, соответственно, состояние АОС крови рыб.

Как известно, интенсивность обмена у бычка-кругляка меняется в зависимости от температуры и сезона года [119]. Зимой этот вид малоактивен и практически не питается [116], что приводит к снижению субстратного обеспечения синтеза протеинов в печени рыб. В то же время зараженность кругляка паразитами [80] и антропогенная нагрузка на севастопольские акватории [121] снижается в холодное время года, что также определяет низкие значения активности АО ферментов эритроцитов (Таблица 3.11) и содержание окисленных

форм белков сыворотки крови рыб из побережья Севастополя зимой (Таблица 3.12).

Повышение АО активности весной (Таблица 3.11), таким образом, обусловлено прогревом морской воды и, как следствие, интенсификацией обменных процессов, питания и активным поступлением низкомолекулярных АО и микроэлементов. В то же время участие АО ферментов в метаболизме физиологически активных веществ в весенний, преднерестовый период бычка-кругляка играет важную роль в процессе созревания гонад, что было отмечено ранее.

Снижение активности КАТ, ГР и ГТ и увеличение содержания окисленных форм белков в сыворотке крови рыб из севастопольских акваторий летом (Таблица 3.11, Таблица 3.12) свидетельствуют об ингибирующем действии сочетанного влияния температуры воды и комплексного загрязнения среды обитания на показатели АОС крови. ПО ОМБ летом в 1,5 раза выше по сравнению с соответствующими показателями рыб весной (Таблица 3.12).

Исследования кислородного режима на выходе из Севастопольской бухты летом 2002-2003 гг. не показали гипоксии придонных вод (содержание растворенного кислорода (РК) в воде не опускалось ниже 4,72 мл/л) [154], что исключает вероятность существенного влияния этого параметра на активность АО ферментов крови черноморского бычка-кругляка.

У рыб из Арабатского залива Азовского моря активность АО ферментов летом возрастает (Таблица 3.11), хотя ПО ОМБ не изменяется (Таблица 3.12), что может быть связано с характерным для этого периода значительным колебанием концентрации РК (1,0-15,7 мг/л) в воде, а также интенсивным прогревом акватории и усилением метаболизма.

Существенные флуктуации уровня O_2 были отмечены в исследованный период в Азовском море, тогда как в Черном море это выражалось в меньшей степени. Минимальная зарегистрированная концентрация РК летом 2003-2005 гг. в Арабатском заливе Азовского моря составила 1,0 мг/л и соответствовала нижней критической границе для бычка-кругляка (1,0-1,8 мг/л) [119].

Соотношение азот-фосфор в этом водоеме смещено в сторону азота, что свидетельствует о гиперпродукции растворенного органического вещества [73]. Значения показателя биохимического потребления кислорода за 5 суток (БПК₅) в 2003-2005 гг. в Арабатском заливе находились в пределах 2,00-3,90 мг·л⁻¹, при ПДК 2,00 мг·л⁻¹ и 3,00 мг·л⁻¹ по рыбохозяйственным и санитарно-бытовым нормативам соответственно. В Черном море на выходе из Севастопольской бухты в 2002-2003 гг. БПК₅ не превышал установленных для этого показателя значений ПДК (0,20-1,90 мг·л⁻¹) [154].

Мелководность Азовского моря обуславливает прогрев морской воды во всей ее толще в летние месяцы. В августе 2003 г. как на поверхности, так и у дна температура воды составляла 25,50-26,00°C. В прибрежье Севастополя средняя температура воды в этот же месяц на глубине 10 м составляла 20,65°C, у дна – 9,92°C [154].

На основании этого можно заключить, что более высокие значения температуры воды придонного слоя Арабатского залива летом, наряду с другими факторами (кислородный режим), могут способствовать увеличению АО активности эритроцитов крови азовского бычка-кругляка.

Осенью активность СОД и ПЕР в крови азовских рыб проявляет тенденцию к снижению, что согласуется с интенсивностью обменных процессов, питания, окончанием нереста у кругляка, а также нормализацией кислородного режима в акваториях и снижением температуры воды (Таблица 3.11).

Сравнительный анализ активности АО ферментов эритроцитов крови рыб из двух морей показал превалирование АО активности у бычков из Арабатского залива весной, летом и осенью (ИП ФАОА) (Таблица 3.11), что в большей степени связано с сезонными изменениями гидролого-гидрохимическими характеристиками Азовского моря, чем с влиянием антропогенных факторов, о чем свидетельствовали более низкое содержание окисленных форм белков в сыворотке крови азовских бычков по сравнению с черноморскими (Таблица 3.12) и отсутствие достоверных отличий между сезонами года.

Таким образом, результаты исследований позволили установить, что показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из двух морей подвержены сезонным изменениям, что обусловлено особенностями гидролого-гидрохимического режима водоемов, а также стадией репродуктивного цикла, активностью питания особей и уровнем антропогенной нагрузки на акватории.

Помимо ферментов крови, сывороточные белки, как компоненты многофункциональной системы, участвуют в поддержании гомеостаза и также являются информативными маркерами состояния организма. Наши исследования позволили установить определенные различия в составе, соотношении и разделении ЭФ-компонентов сывороточных белков бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.

Снижение числа белковых фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови рыб, а также изменение их электрофоретической подвижности были отмечены в экспериментальных условиях при действии отдельных токсикантов на организм рыб и комплексном загрязнении среды обитания [17; 106; 107; 213; 298]. У африканского сома из двух районов Нила, характеризующихся разным уровнем загрязнения, была показана редукция числа белковых фракций на электрофореграммах сыворотки крови рыб из загрязненного участка реки. Определение относительной концентрации белка в зонах позволило установить снижение содержания преальбуминов, альбуминов и трансферринов у рыб из загрязненной акватории, тогда как уровень α -, β - и γ -глобулинов был выше по сравнению с соответствующими показателями рыб из относительно чистого района [213]. Увеличение концентрации глобулинов было выявлено у разных животных, страдающих хроническими заболеваниями, в том числе, вызванными вирусными инфекциями [71].

В наших исследованиях количество белковых фракций в «стандартном» ЭФ-спектре и среднее значение числа белковых компонентов в ЭФ-спектрах черноморских бычков ниже, чем у азовских, тогда как постальбуминовая зона (α -глобулины) изобилует яркими диффузными фракциями, что может

свидетельствовать о модифицирующем влиянии загрязнения на белковый спектр черноморского бычка-кругляка (Рисунок 4.2, Таблица 4.1). В то же время предстартовая зона в «стандартном» ЭФ-спектре черноморских бычков, где локализуются в основном иммуноглобулины, содержит на 2 компонента меньше, чем у азовских рыб (Таблица 4.1). Выявленная особенность может быть следствием подавления специфической защиты организма рыб в неблагоприятных условиях среды. Снижение фракции γ -глобулинов и повышение фракции альбуминов наблюдали в сыворотке крови карпа при смешанной бактериально-вирусной инфекции [71]. Аналогичный тренд был установлен в зоне фракций с высокой подвижностью – преальбуминовой. Основной функцией преальбуминов является транспорт гормонов и, в частности, тироксина, который играет важную роль в регуляции метаболизма и репродукции [13]. Сокращение числа преальбуминовых фракций в «стандартном» ЭФ-спектре черноморских бычков по сравнению с ЭФ-спектром азовских рыб может свидетельствовать о нарушениях обменных процессов, вызванных избыточным содержанием ксенобиотиков в прибрежной зоне Севастополя. В связи с этим изменение фракционного состава преальбуминов может косвенно отражать нарушение гормонального статуса организма [109], о чем свидетельствуют более низкие значения ГСИ у самок черноморских рыб (Раздел 2.1, Таблица 2.1).

Установлено увеличение Кэф альбумина в «стандартном» ЭФ-спектре бычка-кругляка из побережья Севастополя по сравнению с таковым у рыб из Арабатского залива Азовского моря (Рисунок 4.2, Таблица 4.1). Подобная тенденция прослеживалась у султанки и скорпены, содержащихся в протоке, аквариуме и аквариуме с сублетальными концентрациями ПХБ. По результатам исследований Кэф альбумина увеличивался у особей, находившихся в аквариуме, по сравнению с протоком, тогда как у опытных рыб этот показатель снижался до значений, характерных для интактных [106]. Увеличение относительной электрофоретической подвижности альбумина и появление второго компонента в альбуминовой зоне были также отмечены у самок и самцов бычка-кругляка при гамма-воздействии [107].

Таким образом, различия, полученные при сравнении электрофоретических характеристик белков сыворотки крови бычка-кругляка из двух морей, могут зависеть от всех перечисленных выше факторов, однако генетические различия, наряду с антропогенным фактором, по нашему мнению, являются ведущими. В то же время существенное влияние на белковый обмен оказывает обеспеченность пищей, потребляемой рыбами, что также объясняет высокие значения числа белковых фракций в ЭФ-спектрах бычков, обитающих в богатом пищевыми ресурсами Арабатском заливе Азовского моря.

Среди сывороточных белков альбумин является важным многофункциональным белком сыворотки крови. Он участвует в пластическом обмене у рыб, поддерживает коллоидно-осмотическое давление крови, образует растворимые комплексы со многими веществами (липиды, гормоны, витамины, билирубин и в том числе ксенобиотики) и транспортирует их к местам утилизации [7].

В наших исследованиях содержание альбумина в 3 раза выше в сыворотке крови бычка-кругляка из юго-западной части Азовского моря по сравнению с таковым у рыб из севастопольских акваторий, что может зависеть от особенностей гидрохимических характеристик среды обитания (соленость, БПК₅), пищевых ресурсов и антропогенной нагрузки в районах добычи рыб. Так, в сравнительных исследованиях, проведенных на морских и речных угрях, было установлено, что средний уровень альбумина в 10 раз выше у рыб, отловленных в пресной воде [65]. Существенное влияние на содержание альбумина оказывает рацион питания [163], что также объясняет более высокий уровень этого белка в сыворотке крови бычков, обитающих в богатом пищевыми ресурсами Арабатском заливе Азовского моря. Кроме того, значительные концентрации ксенобиотиков в севастопольских бухтах способствуют нарушению транспортной функции альбумина, его окислительной модификации и выведению поврежденных молекул из кровяного русла. Снижение уровня альбумина в сыворотке крови рыб, подвергшихся воздействию сточных вод [240], эндосульфана [308] и комплексного загрязнения в среде обитания [126] показано в литературе.

Анализ электрофоретических свойств альбумина рыб из двух морей также позволил установить определенные отличия. Яркая диффузная фракция была обнаружена на дискэлектрофореграммах белков сыворотки крови черноморских и азовских бычков в диапазоне 0,7-0,8, что характерно и для сывороточного альбумина человека, однако электрофоретическая подвижность альбуминовой фракции сыворотки черноморских бычков значительно выше, чем у азовских рыб. Выявленная закономерность может быть результатом генных мутаций или особенностей связывающей и транспортной функций этого белка у рыб из двух морей [262]. Не последнюю роль могут играть различия в спектре питания черноморских и азовских бычков, обуславливающие различия в липидном и жирнокислотном составе пищи. Эти компоненты, при связывании с альбумином, изменяют его физические и химические свойства и, как следствие, электрофоретическую подвижность [254].

Снижение концентрации альбумина было выявлено в сыворотке крови азовских бычков 4 лет по сравнению с 2-3 летними рыбами ($r = -0,85$) (Рисунок 4.3), что может быть следствием снижения метаболических превращений в организме и белоксинтезирующей функции печени. Сокращение доли альбумина у рыб с возрастом было также показано в сыворотке крови белого толстолобика [1] и радужной форели [90].

Возрастные изменения электрофоретической подвижности альбумина в большей степени были выражены в ЭФ-спектрах черноморских бычков (Таблица 4.2). Полученные результаты согласуются с возрастными изменениями метаболических превращений в организме, включая изменение концентрации липидов и билирубина в сыворотке крови в процессе онтогенеза [182], а также увеличение содержания продуктов ОМБ, что было показано для старших возрастных групп бычка-кругляка из акваторий Севастополя (Таблица 3.4). Продукты окисления биомолекул взаимодействуют с белковыми аминокетонами, что приводит к увеличению отрицательного заряда и конформационным изменениям молекулы альбумина. Как следствие, подвижность альбумина может отличаться в ЭФ-спектре молодых и старых рыб.

По результатам многих исследователей белковый состав сыворотки крови самок и самцов рыб относительно стабилен на протяжении всего года и не отличается, за исключением периода созревания гонад и нереста. В то же время различия наблюдаются как в относительном, так и в абсолютном содержании всех белковых фракций, в том числе альбумина [56; 99; 251]. Концентрация общего белка и сывороточного альбумина в период созревания гонад и нереста были выше в сыворотке крови самок судака [53] по сравнению с показателями самцов этого вида. В наших исследованиях различий между содержанием и электрофоретической подвижностью альбумина у разнополых особей из двух морей не выявлено (Рисунок 4.4, Таблица 4.3). Однако изучение содержания этого белка в сыворотке крови самок (Рисунок 4.5 Б) и самцов (Рисунок 4.5 А) бычка-кругляка в разные периоды репродуктивного цикла позволило установить определенные отличия. Концентрация альбумина в сыворотке крови самцов азовских рыб достоверно выше в преднерестовый период по сравнению с периодом покоя, что может быть обусловлено активным транспортом компонентов, необходимых для созревания гонад. У нерестящихся самцов уровень альбумина снижается, что объясняется прекращением питания в период размножения и активной охраны гнезда [56].

Исследование электрофоретических свойств альбумина у черноморских и азовских самок и самцов бычка-кругляка в зависимости от стадии зрелости гонад позволило выявить ряд особенностей. Подвижность альбумина значительно выше на дискэлектрофореграммах самок и самцов рыб из двух морей во время нереста по сравнению с периодом покоя (Таблица 4.4). Выявленная особенность является следствием увеличения концентрации половых гормонов в крови в период созревания гонад и нереста, что также влияет на физико-химические свойства альбумина, модифицируя его электрофоретическую подвижность [176; 205].

Наряду с вышеперечисленными факторами физиологический статус гидробионтов в значительной степени коррелирует с сезонными флуктуациями среды, включая температуру воды, концентрацию кислорода и обеспеченность пищей [240]. Так, концентрация альбумина в сыворотке крови азовских бычков

летом существенно выше соответствующих значений у черноморских рыб (Рисунок 4.6). Наиболее вероятными причинами этого являются богатая кормовая база [57] и высокий уровень эвтрофикации Азовского моря в теплое время года, что было показано и другими авторами [255]. В то же время, установленные нами сезонные отличия в подвижности альбумина, в большей мере были выражены для ЭФ-спектров черноморских бычков (Таблица 4.5). Кэф альбумина рыб, отловленных в прибрежье Севастополя весной, был выше по сравнению с показателем рыб из летних уловов и совпадал с пиком нереста этого вида в Черном море. У азовских рыб наблюдали смещение верхних границ белковой фракции альбумина летом без увеличения подвижности в ЭФ-спектре в целом. В результате, подвижность альбумина в наибольшей степени варьировала в ЭФ-спектре черноморских бычков, тогда как сезонные вариации гидрохимических параметров воды значительно шире в Азовском море. Выявленная особенность может быть следствием увеличения концентрации ксенобиотиков в акваториях Севастополя в летне-осенний период, что в значительной степени влияет на транспортную функцию сывороточных белков и согласуется с литературными данными. Изменение ЭФ-спектра белков сыворотки крови тиляпии (*Oreochromis mossambicus*) было установлено при содержании рыб в среде с афлатоксином на протяжении 30 дней [309].

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. физиологический статус рыб, а также сезонные флуктуации гидрохимических параметров среды существенно влияют на связывающую и транспортную функции альбумина, что подтверждают изменения его концентрации в сыворотке крови и электрофоретической подвижности в спектрах;
2. различия, установленные в ЭФ-спектрах и концентрации альбумина в сыворотке крови бычка-кругляка из районов исследования в двух морях, могут быть обусловлены генетическими особенностями, а также разным состоянием кормовой базы и уровнем загрязнения.

В настоящее время на физиолого-биохимический статус рыб существенное влияние оказывает антропогенное воздействие, сопряженное с загрязнением морской среды. В этом плане тестируемые нами показатели являются информативными биомаркерами, позволяющими оценить состояние рыб и качество среды их обитания.

В 2003 г. активность отдельных АО ферментов была достоверно снижена в эритроцитах крови рыб из наиболее загрязненной бухты Стрелецкой (СОД) и бухты Мартыновой (ПЕР, ГР) по сравнению с соответствующими показателями рыб из бухты Карантинной (Таблица 5.1). Содержание кетопроизводных нейтрального ($p \leq 0,05$) и альдегидопроизводных основного ($p \leq 0,05$) характера было выше в сыворотке крови рыб из бухты Стрелецкой (Таблица 5.3). Снижение активности АО ферментов у рыб из акваторий с высоким уровнем комплексного загрязнения показано в работах ряда авторов [121; 175; 199].

В 2012 г. активность СОД и КАТ снижалась, а ПЕР увеличивалась в эритроцитах крови рыб из бухты Стрелецкой (Таблица 5.1). При этом уровень ОМБ был выше у бычка-кругляка из б. Мартынова (Таблица 5.3).

Анализ долговременной динамики показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови бычка-кругляка из севастопольских бухт в 2003 г. и более современный период (Таблица 5.1, Таблица 5.3) позволил заключить, что наряду с общей тенденцией возрастания активности КАТ, СОД и ГТ у рыб в современный период есть и специфические отличия. У бычков из бухты Стрелецкой активность ПЕР увеличилась более чем в 1,5 раза, а у рыб из бухты Мартынова активность ГР возросла почти на порядок. Вероятно, продолжающееся нефтяное загрязнение бухты Стрелецкой привело к росту активности ПЕР крови, что характерно для рыб, обитающих в условиях нефтяного загрязнения, и было показано на морском ерше [121]. Увеличение активности ГР в крови рыб из бухты Мартынова, вероятно, обусловлено усилением роли глутатионовой системы в обеспечении АО защиты организма при высоких концентрациях токсикантов в грунтах, что характерно для этой акватории и согласуется с повышением более чем 2,5 раза активности ГТ. В то же время в

2012 году у бычка-кругляка из бухт Мартынова и Карантинной наблюдается четко выраженная тенденция увеличения содержания продуктов окисления сывороточных белков, тогда как в Стрелецкой бухте этого не происходит, что зависит от концентрации белка в сыворотке крови рыб из разных акваторий, уровень которого почти в 2 раза ниже у рыб из б. Стрелецкой по сравнению с таковым у рыб из б. Мартынова ($26,76 \pm 4,89$; $48,20 \pm 3,04$ и $40,49 \pm 4,97$ г/л соответственно в бухтах Стрелецкой, Мартынова и Карантинной).

В 2003 г. не установлено достоверных отличий между исследуемыми биомаркерами крови рыб из двух районов Арабатского залива Азовского моря, тогда как в 2011-2012 гг. отмечены снижение активности КАТ, ГР эритроцитов крови (Таблица 5.2) и увеличение содержания альдегидопроизводных нейтрального характера (Таблица 5.4) в сыворотке крови рыб из побережья с. Мысовое, находящегося в районе нефтегазовых разработок.

Анализ межгодовой динамики биомаркеров крови рыб из двух районов Арабатского залива Азовского моря позволил установить определенные сходства и отличия (Таблица 5.2, Таблица 5.4). Активность СОД, КАТ и ГР достоверно увеличивалась в эритроцитах крови рыб из района с. Семеновка в 2011-2012 гг. У рыб из второй акватории (р-он с. Мысовое) активность СОД и ПЕР увеличивалась, а КАТ снижалась в эритроцитах крови рыб в более современный период. При этом содержание продуктов нейтрального характера достоверно увеличивалось в сыворотке крови бычка-кругляка из двух акваторий Арабатского залива в 2011-2012 гг. (Таблица 5.4), что может быть связано с усилением хозяйственной деятельности и ухудшением экологической обстановки в юго-западной части Азовского моря [47].

Таким образом, состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови рыб из района с. Семеновка свидетельствует о преобладании антиоксидантных процессов над прооксидантными по сравнению с таковыми у рыб из побережья с. Мысовое. Выявленная особенность может быть связана как с разным уровнем загрязнения в районах исследования, так и с наличием факторов, позволяющих рыбам более успешно адаптироваться к действию неблагоприятных факторов в

районе с. Семеновка, например, за счет кормовой базы. Концентрация азота, фосфора и кремния, необходимых для развития микроводорослей, выше в воде с. Семеновка [155], что создает благоприятные условия для развития фитопланктона и, как следствие, моллюсков – основного пищевого объекта в рационе бычка-кругляка. Данное предположение подтверждают результаты сравнительного анализа размерно-массовых и морфофизиологических показателей бычка-кругляка из двух районов Арабатского залива, представленные в разделе 2.1 (Таблица 2.1).

Размер и масса самок и самцов, а также величина половых желез и ГСИ у самок бычка-кругляка из района с. Семеновка были выше, чем у рыб из побережья с. Мысовое, что говорит о более благоприятных для нагула и нереста условиях в первой акватории. В то же время масса печени и значения ИП выше у бычков из района с. Мысовое, что может зависеть от уровня загрязнения и интенсивности генеративного обмена у рыб в районах исследования.

В целом, несмотря на снижение уровня загрязнения севастопольских бухт в современный период по сравнению с 1990-ми – началом 2000-х, следует отметить, что долговременное загрязнение акваторий вызывает соответствующие пост-эффекты у донных видов рыб, что выражается в снижении размерно-массовых характеристик бычка-кругляка и увеличении АО активности и содержания продуктов ОМБ. Аналогичные эффекты, отмеченные у рыб из Арабатского залива Азовского моря, обусловлены усилением антропогенной нагрузки в этом регионе в настоящий период.

Учитывая тот факт, что ТЭ являются одними из приоритетных загрязнителей водной среды, и севастопольских бухт в частности [89], а также обладают высокими кумулятивными свойствами и даже в незначительных количествах способны влиять на состояние защитных систем организма [81; 117; 174; 180] и метаболические процессы в целом [30]. Изучали влияние содержания ТЭ в мышцах рыб на исследуемые биомаркеры крови черноморского бычка-кругляка.

Как известно, одним из наиболее важных защитных механизмов при повышении концентрации ТЭ у рыб является синтез металлотеонеинов (МТ) – цитоплазматических белков, содержащих до 30% цистеина. Считается, что физиологической функцией МТ является аккумуляция ионов Zn, высвобождающихся в клетках в результате изменения интенсивности метаболизма. Однако благодаря уникальному аминокислотному составу они способны связывать и другие ионы металлов [27], причем Hg, Cd и Cu могут конкурентно вытеснять Zn из МТ [30].

Наряду с МТ, значительную роль в нейтрализации негативных эффектов ТЭ играет глутатион, определяющий металлсвязывающую функцию цитоплазмы. Этот трипептид обладает высокой афинностью к катионам тяжелых металлов и в первую очередь участвует в их инактивации [274].

Превышение связывающей способности МТ, а также истощение запасов восстановленного глутатиона приводят к образованию соединений металла с неспецифическими молекулами и/или появлению металлов в свободном виде [169]. Следствием этого является блокирование различных биохимических реакций, включая антиоксидантные [117; 174; 179], усиление перекисного окисления биомолекул [16; 129; 139; 276] и многие другие патологические изменения [30].

В наибольших количествах в тканях кругляка содержится Zn (3,0-3,48 мг/кг) (Таблица 5.5), который поступает с пищей и является важным эссенциальным элементом. Инактивация СОД вместе с увеличением содержания глутатиона, участвующего в гомеостазе Zn в клетке, является чувствительным тестом на токсичность этого элемента [139; 252]. В наших исследованиях сильная и значительная положительная связь установлена между уровнем Zn и активностью практически всех АО ферментов в эритроцитах крови бычка-кругляка, включая СОД (Таблица 5.6), тогда как с доминирующими в сыворотке крови окисленными формами белков (D 346; 370; 430) выявлена значительная и умеренная отрицательная связь (Таблица 5.7). В подобных исследованиях на 6 черноморских видах рыб коэффициенты корреляции между содержанием цинка и активностью

АО ферментов эритроцитов крови в большинстве случаев носили отрицательные значения [96], что, вероятно, связано с более высоким, чем у кругляка, содержанием этого элемента в тканях рыб (3,64-5,41 мг/кг). В то же время корреляционный анализ между концентрацией цинка и содержанием продуктов основного и кетопроизводных нейтрального характера у этих же видов позволил установить отрицательную значительную и умеренную связь, соответственно [16]. Выявленные различия в характере связи между содержанием цинка и активностью АО ферментов у бычка-кругляка и 6 черноморских видов рыб, вероятно, зависят от концентрации и видовых особенностей процессов детоксикации цинка в тканях, что было показано на карпе. Действие низких концентраций цинка не вызывало изменения активности АО ферментов и содержания небелковых тиолов в печени карпа относительно контроля, тогда как высокие его концентрации угнетали активность СОД и МТ в гепатоцитах печени, усиливая образование продуктов окислительной деструкции белков и липидов [137].

Другим важнейшим биофильным элементом является Cu [120]. У кругляка выявлено слабое влияние Cu на активность АО ферментов, кроме СОД и ПЕР (Таблица 5.6), причем в первом случае связь отрицательная, что говорит о возможной инактивации этого фермента в результате его окислительной модификации [86] и/или снижении в организме МТ, когда их функции могут брать на себя другие белки-мишени, в том числе СОД [256; 277]. Как следствие, коэффициенты корреляции между содержанием продуктов нейтрального и альдегидопроизводных основного характера и меди – значительные положительные (Таблица 5.7). Подобная тенденция между активностью СОД и содержанием меди установлена в работах других авторов на морских [96] и пресноводных рыбах [137]. Так, в опытах на карпе при действии низких, средних и высоких концентраций меди активность этого фермента значительно снижалась уже при действии низких концентраций с увеличением содержания небелковых тиолов и уменьшением белковых. При действии средних и высоких концентраций меди наблюдали снижение содержания МТ, а также небелковых тиолов с

одновременным, значительным увеличением белковых, что авторы объясняют исключительной окислительной способностью меди по отношению именно к небелковым тиолам, таким как глутатион [137]. В работе этого же автора на беззубке лебединой (*Anodonta cygnea*) содержание окисленных форм белков (D 370; 430) значительно увеличивалось в пищеварительной железе при концентрации меди в среде 0,2 мг/л, а в естественных условиях обитания – и в жабрах. Содержание малонового диальдегида при этом не изменялось в тканях моллюсков в зависимости от условий существования, что говорит о высокой чувствительности показателей ОМБ к действию ТЭ [27]. Таким образом, также как и в случае с цинком, действие меди на прооксидантно-антиоксидантный статус организма зависит от ее концентрации в тканях и видовых особенностей детоксикации.

As относят к условно эссенциальным, иммунотоксичным элементам [120]. В нашей работе сильная связь установлена между уровнем этого элемента и активностью СОД (-) и ПЕР (+) (Таблица 5.6). С продуктами нейтрального и альдегидопроизводными основного характера - связь значительная положительная (Таблица 5.7). Для 6 черноморских видов рыб значительная отрицательная связь установлена между концентрацией мышьяка и активностью ГР [96], тогда как с доминирующими продуктами окисления (D 346; 370; 430) связь умеренная положительная [16].

Pb является канцерогенным и тератогенным элементом. Его токсическое действие обусловлено способностью образовывать связи с производными цистеина, сульфгидрильными, имидозольными и карбоксильными группами [120]. У бычка-кругляка установлена сильная и значительная корреляционная зависимость между активностью ПЕР, СОД, КАТ и содержанием свинца в его тканях (Таблица 5.6). Концентрация этого элемента в наибольшей степени повлияла на процессы ОМБ, о чем свидетельствуют высокие коэффициенты корреляции при всех длинах волн, кроме D 530 (Таблица 5.7). Также, как и у кругляка, свинец оказывал существенное влияние на активность АО ферментов [96] и процессы окислительной модификации сывороточных белков в крови ерша,

налима, султанки, мерланга и ставриды [16]. У карпа ионы свинца вызывали окислительный стресс уже при низких его концентрациях. В печени снижалась активность СОД и КАТ, что приводило к значительному увеличению окислительного повреждения белков и липидов [137].

Токсичное действие Hg на организм обусловлено ее высоким сродством к функциональным группам белков (-SH, -NH₂, -COOH, -OH), что объясняет максимальные концентрации этого элемента в мышечной ткани животных [30]. У кругляка Hg существенно ингибировала активность практически всех АО ферментов, в том числе глутатионзависимых (Таблица 5.6), что привело к интенсификации процессов ОМБ, о чем свидетельствуют высокие коэффициенты корреляции (Таблица 5.7). Для других черноморских рыб значительная отрицательная связь была установлена между активностью КАТ, ГР и содержанием этого элемента в их тканях [96]. Корреляционная зависимость с продуктами окисления белков слабая или умеренная [16].

В водоемах ТЭ обычно присутствуют в достаточно низких концентрациях, и, как правило, гидробионты подвергаются воздействию либо смеси нескольких металлов, либо отдельного металла в комбинации с органическими загрязнителями [198]. В наших исследованиях высокую чувствительность к общему содержанию ТЭ (Σ ТЭ) в мышечной ткани проявили глутатионзависимые ферменты крови. С другими ферментами Σ ТЭ коррелировал слабо (Таблица 5.6). Сильная и значительная положительная корреляция была установлена между этим показателем и содержанием продуктов основного и альдегидопроизводных нейтрального характера (Таблица 5.7). В работе других авторов также отмечено влияние смеси металлов на прооксидантно-антиоксидантный статус организма [202].

Для того, чтобы определить, какой элемент в большей степени оказывает влияние на АО ферментативную систему и какой фермент является наиболее чувствительным к содержанию токсичных элементов, нами была составлена таблица, в которой типы связей между исследуемыми параметрами обозначены в соответствии со значением коэффициентов корреляции (Таблица 6.1).

Таблица 6.1 Степень зависимости между активностью антиоксидантных ферментов эритроцитов крови и содержанием токсичных элементов в мышцах бычка-кругляка из побережья Севастополя

Фермент	Cu	Pb	Zn	As	Hg
КАТ	-	++	+++	+	+++
СОД	++	+++	+++	+++	++
ПЕР	++	+++	+++	+++	++
ГР	-	+	++	-	+++
ГТ	-	-	++	-	+++

Примечание: – - слабая связь ($0 < r < 0,3$); + - умеренная ($0,3 < r < 0,5$); ++ - значительная ($0,5 < r < 0,7$); +++ - сильная ($0,7 < r < 0,9$)

По степени воздействия на ферментативную АОС кругляка тяжелые металлы можно распределить следующим образом: Hg, Zn > Pb > As > Cu. По степени чувствительности к ТЭ АО ферменты расположились в следующей последовательности: СОД, ПЕР > КАТ > ГР > ГТ.

Выявленная в наших исследованиях высокая чувствительность СОД к действию ТЭ согласуется с данными других исследователей [96; 137; 277]. При ослаблении ее функции концентрация супероксиданиона возрастает. В условиях избытка ионов металлов переменной валентности возможно неферментативное каталитическое превращение $O_2^{\cdot-}$ с образованием перекиси водорода, являющейся субстратом и активатором КАТ. Разбалансировка системы СОД – КАТ приводит к накоплению АФК и продуктов ОМБ, что индуцирует активность ПЕР, обезвреживающей H_2O_2 и гидроперекиси жирных кислот. С этим, вероятно, и связаны высокие коэффициенты корреляции между содержанием ТЭ и активностью перечисленных выше ферментов.

В то же время сильная отрицательная корреляционная зависимость между активностью глутатионзависимых ферментов и содержанием ТЭ установлена только для Hg. В исследованиях зарубежных авторов показано подавление активности ГТ в цитозольной фракции печени остроноса *Liza saliens* при действии

ТЭ, среди которых наиболее токсичным для этого фермента оказалась ртуть [285], что согласуется с нашими данными.

По аналогии с АО ферментами была составлена таблица, позволяющая определить степень влияния каждого из элементов на процессы окислительной модификации белков сыворотки крови (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 Степень зависимости между содержанием окисленных форм белков в сыворотке крови и токсичных элементов в мышцах бычка-кругляка из побережья Севастополя

Длина волны, нм	Cu	Pb	Zn	As	Hg
346	++	+++	++	++	+++
370	++	+++	++	++	+++
430	++	+++	+	++	+++
530	-	+	+	-	-

Примечание: – - слабая связь ($0 < r < 0,3$); + - умеренная ($0,3 < r < 0,5$); ++ - значительная ($0,5 < r < 0,7$); +++ - сильная ($0,7 < r < 0,9$)

Так же как и для АО ферментов, наибольшее влияние на процессы окислительной модификации белков оказывали Pb, Hg и Zn ($Pb > Hg > Zn$, Cu, As). Эссенциальные и условно эссенциальные элементы занимали третье место.

Таким образом, действие как низких, так и высоких концентраций ТЭ способно модулировать АО ответ. Индукция активности АО ферментов является адаптивной реакцией организма на окислительный стресс. Однако тяжелые металлы в высоких концентрациях способны подавлять защитные ферментные системы клетки, приводя к усилению пероксидации белков и липидов.

На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. уровень ТЭ в мышечной ткани бычка-кругляка существенно влияет на прооксидантно-антиоксидантный статус организма, что подтверждают значения коэффициентов корреляции;

2. влияние ТЭ на АО ферментативную систему и уровень окислительной модификации белков зависит от концентрации, токсичности/ биофильности элемента и эффективности механизмов его детоксикации, определяющих адаптационные возможности вида.

Вместе с тем, для водной среды характерно комплексное загрязнение, которое существенным образом модифицирует белковый состав сыворотки крови рыб.

Согласно полученным результатам (Рисунок 5.2, Таблица 5.8), среднее число фракций в ЭФ-спектрах и число «редких» компонентов в целом у рыб из трех севастопольских акваторий не отличались, тогда как количество белковых полос в большей степени варьировало в сыворотке крови бычков из бухты Карантинной. Выявленные различия, вероятно, являются следствием влияния скорее естественных факторов, чем антропогенного воздействия на белковый состав сыворотки крови рыб из этой акватории. Расположение Карантинной бухты обеспечивает свободный заход рыбы из открытой части моря и, соответственно, приток генов, что увеличивает вариабельность параметров ЭФ-спектров. В то же время сокращение числа фракций, насыщение постальбуминовой зоны диффузными компонентами и увеличение подвижности альбумина в «стандартных» ЭФ-спектрах бычков из открытой, но сильно загрязненной бухты Стрелецкой и менее загрязненной, закрытой бухты Мартыновой могут свидетельствовать о модифицирующем влиянии ксенобиотиков на белковый состав сыворотки крови рыб из этих акваторий. Редукция белковых фракций в ЭФ-спектрах сыворотки крови рыб при действии токсикантов известна из литературы и может быть следствием как постсинтетических модификаций, так и нарушения генетических структур, ответственных за синтез данных белков [23; 106; 309]. В обоих случаях это может быть результатом попадания в организм избыточных количеств ксенобиотиков из воды, уровень загрязнения которой в придонном слое Стрелецкой и Мартыновой бухт выше, чем в Карантинной. Так, снижение числа белковых полос в «стандартном» ЭФ-спектре бычка-кругляка с 28 до 19 было установлено в начале

90-х годов, характеризующихся максимальным загрязнением воды в севастопольских бухтах по сравнению с 80-ми годами, а подвижность альбуминовой фракции увеличилась от 0,72-0,75 до 0,75-0,80 [23]. В период настоящего исследования (2003 г.) количество белковых фракций в «стандартных» ЭФ-спектрах рыб из бухт Стрелецкой и Карантинной было равным 19, также как и в 90-е годы, тогда как у рыб из Карантинной – 20. Подвижность альбумина у рыб из бухт Стрелецкой и Мартынова находилась в пределах 0,75-0,80 и 0,76-0,81 соответственно, а в ЭФ-спектре бычков из более чистой акватории – Карантинной – этот показатель был близок к значениям рыб в начале 80-х годов – 0,74-0,77. Отдельного обсуждения заслуживает увеличение числа диффузных фракций в ЭФ-спектрах рыб из бухт Стрелецкой и Мартыновой, аналогичное таковому в ЭФ-спектрах рыб в 90-е годы. Выявленная особенность свидетельствует об усилении синтеза данных белков как неспецифической ответной реакции на токсический стресс, связанной с нарушением функции клеток печени, синтезирующих сывороточные белки [23; 213].

В то же время анализ содержания «редких» белковых фракций в ЭФ-спектрах черноморских бычков показал, что 89 % из них приходится на долю преальбуминов. В клинической лабораторной практике было установлено, что болезни, протекающие с патологическими изменениями в печени пациентов, приводят к редукции преальбуминовых фракций [229]. Сокращение числа преальбуминовых фракций в ЭФ-спектре сыворотки крови было показано и на рыбах при действии ПХБ, γ -воздействии и комплексном загрязнении среды обитания [106; 107]. Таким образом, гетерогенность электрофоретического состава преальбуминов может характеризовать статус организма, в том числе и различные патологические состояния, вызванные болезнями и/или неблагоприятными воздействиями.

В наших исследованиях также установлены различия в составе преальбуминов сыворотки крови рыб из бухт с разным уровнем загрязнения (Рисунок 5.4). Так, в самой грязной бухте Стрелецкой выявлен компонент с

самым высоким значением $K_{\text{ЭФ}} = 1,31$, который отсутствует в сыворотке крови рыб из других бухт. Вместе с тем у рыб из замкнутой бухты Мартынова ЭФ-спектр преальбуминов обеднен по сравнению с этими показателями рыб из двух других акваторий, имеющих непосредственное сообщение с открытой частью моря. Отсутствие некоторых преальбуминовых фракций у рыб из бухт Стрелецкой и Мартынова, вероятно, обусловлено модифицирующим действием токсикантов. Не исключено также, что коммунальные сточные воды, содержащие значительные количества веществ, по своей химической структуре похожих на гормоны, транспорт которых осуществляется преальбуминами сыворотки крови, образуют с ними комплексы и изменяют их физико-химические и электрофоретические свойства.

В отличие от результатов электрофоретического анализа, полученных для черноморских бычков, изменения, установленные в «стандартных» ЭФ-спектрах белков сыворотки крови бычка-кругляка из двух районов Арабатского залива, носили несущественный характер (Рисунок 5.3). Более значимые различия были установлены в статистических характеристиках числа фракций в ЭФ-спектрах бычков из исследуемых акваторий (Таблица 5.9), что, по нашему мнению, является скорее следствием разного состояния кормовой базы, чем уровня загрязнения в них. В исследованиях ряда авторов было выявлено влияние характера и интенсивности питания, а также состояния кормовой базы на уровень сывороточного белка и белковый обмен в целом [134]. В эксперименте на карпе, зараженном бактериальной инфекцией, было показано, что группа рыб, получавшая более сбалансированное питание (растительные иммуностимуляторы), обладала большей резистентностью к возбудителю инфекции, о чем свидетельствовали более высокие, чем у контрольной группы, значения активности лизоцима и уровня сывороточного белка [159]. В наших исследованиях верхние и нижние пределы числа фракций, среднее значение числа фракций в ЭФ-спектрах, а также количество вариантов ЭФ-спектров по числу фракций в них выше в ЭФ-спектрах бычков из района с. Семеновка, характеризующегося богатой кормовой базой. При этом количество «редких»

компонентов и коэффициент вариации выше у бычков из побережья с. Мысовое, что свидетельствует о более благоприятных и стабильных для жизни условиях у бычков из района с. Семеновка и подтверждается высокими значениями размерно-массовых показателей (Раздел 2.1, Таблица 2.3).

Таким образом, по результатам электрофоретического и статистического анализа белков сыворотки крови бычка-кругляка из бухт Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения были выявлены определенные различия, которые у черноморских бычков обусловлены действием как естественных факторов, так и антропогенных, тогда как у азовских рыб (в 2003 г.) – разным состоянием кормовой базы в исследуемых районах.

На основании данных, представленных в Главе 6, можно заключить, что тестируемые параметры бычка-кругляка являются информативными для оценки физиологического состояния рыб и качества среды их обитания, с учетом возрастных, половых и сезонных особенностей состояния биомаркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морфоэкологические и биохимические показатели физиологического состояния рыб широко применяются при оценке качества водных объектов и состояния биоресурсов, изучении механизмов адаптации рыб к экстремальным или новым, изменяющимся условиям обитания, в том числе после интродукции. В то же время корректная интерпретации результатов биохимических исследований требует изучения естественных изменений тестируемых показателей в популяциях исследуемых видов. На основании этого изучали особенности половых, возрастных и сезонных изменений показателей прооксидантно-антиоксидантной системы крови в популяциях бычка-кругляка из районов исследования в Черном и Азовском морях, которые учитывали при оценке токсичности морской среды.

Обнаружены возрастные изменения анализируемых маркеров крови рыб, которые характеризовались снижением активности АО ферментов, концентрации и ЭФ-подвижности альбумина и увеличением содержания продуктов ОМБ у старших возрастных групп бычка-кругляка. Выявленные особенности могут быть следствием снижения метаболических превращений в организме и белоксинтезирующей функции печени, а также усиления перекисных реакций в организме с возрастом. Снижение концентрации сывороточного альбумина [1; 90], активности АО ферментов [162; 192] и увеличение содержания продуктов окисления белков [121; 164] в тканях рыб с возрастом было показано в работах других авторов, что соответствует основным положениям свободнорадикальной теории старения [228].

Анализ исследованных параметров не показал наличия половых различий у рыб из Арабатского залива, тогда как у черноморских бычков прооксидантные реакции превалировали над антиоксидантными в крови самцов по сравнению с таковыми у самок. Выявленные межполовые различия могут быть связаны как с особенностями накопления ксенобиотиков и избирательностью ответных реакций

в тканях рыб разного пола, так и спецификой нерестового поведения у самцов бычка-кругляка в условиях хронического загрязнения севастопольских бухт.

Показано увеличение активности большинства АО ферментов эритроцитов, концентрации и ЭФ-подвижности альбумина крови у самок и самцов рыб из двух морей в преднерестовый период, что отражает значительные метаболические перестройки молекулярных систем организма в период созревания гонад и согласуется с результатами других авторов [6; 56]. В то же время максимальные значения общей АО активности крови были установлены во время нереста у рыб из двух морей за исключением самцов черноморских бычков. Выявленная особенность, по нашему мнению, может быть связана с высоким уровнем комплексного загрязнения севастопольских бухт, что способствует истощению защитных ресурсов организма самцов черноморских бычков и нарушению прооксидантно-антиоксидантного баланса на фоне стрессовой ситуации – нереста.

Показано влияние сезонных флуктуаций гидролого-гидрохимических параметров морских вод [152] и связанных с ними стадией полового цикла, активностью питания особей, а также уровнем загрязнения акваторий на состояние биомаркеров бычка-кругляка из района Севастополя и Арабатского залива Азовского моря.

Установлено повышение содержания продуктов ОМБ сыворотки крови у рыб из загрязненных акваторий, тогда как АО реакции имеют неоднозначный характер. Увеличение антропогенной нагрузки в среде обитания вызывает индукцию активности АО ферментов и является адаптивной реакцией организма на окислительный стресс. Ингибирование этих параметров отмечено в наиболее загрязненных районах исследования (Стрелецкой) и свидетельствует о токсическом действии ксенобиотиков.

Результаты исследований показали зависимость между активностью АО ферментов эритроцитов крови, содержанием продуктов окисления белков и концентрацией ТЭ в мышцах бычка-кругляка из прибрежной зоны Севастополя. Самыми чувствительными к накопленным в тканях элементам являются

ферменты СОД и ПЕР, тогда как наиболее токсический эффект на организм оказывают Pb и Hg в результате связывания с функциональными группами биомолекул.

Сравнительный анализ «стандартных» ЭФ-спектров и статистических показателей числа фракций в ЭФ-спектрах рыб из бухт Черного и Азовского морей с разным уровнем загрязнения позволил выявить ряд отличий. Показано сокращение числа белковых компонентов, увеличение доли диффузных фракций и подвижности альбумина в ЭФ-спектрах рыб из наиболее загрязненных севастопольских бухт. У азовских бычков эти различия менее выражены и, вероятно, в большей степени зависят от естественных факторов, таких как гидрохимические характеристики воды и состояние кормовой базы.

Установлено снижение размерно-массовых характеристик, увеличение активности АО ферментов эритроцитов крови и накопление окисленных форм белков в сыворотке крови рыб из районов исследования в двух морях в 2011-2012 гг. по сравнению с соответствующими показателями в 2003 г. Выявленные особенности обусловлены долговременным загрязнением севастопольских бухт, нефте- и газодобычей в юго-западной части Азовского моря, что привело к соответствующим пост-эффектам у представителей донной ихтиофауны, таких как бычок-кругляк.

Таким образом, высокие концентрации ксенобиотиков в воде севастопольских акваторий оказывают определяющее влияние на состояние молекулярных биомаркеров, а хронический характер загрязнения – на размерно-массовые характеристики бычка-кругляка. Ухудшение экологической обстановки в Арабатском заливе в 2011-2012 гг. существенно повлияло на тестируемые показатели рыб.

Сравнительный анализ биохимических, размерно-массовых и морфофизиологических характеристик бычка-кругляка из двух морей позволил установить ряд отличий, обусловленных географической разобщенностью мест обитания этого вида, имеющих различные гидрохимические и гидрологические параметры, и уровнем загрязнения в них. Преобладание АО процессов над

прооксидантными установлено в крови бычков из юго-западной части Азовского моря по сравнению с состоянием этих процессов у рыб из севастопольских акваторий. Показано снижение числа белковых фракций, увеличение доли диффузных компонентов и «редких» фракций в ЭФ-спектрах черноморских бычков. Для рыб из прибрежных районов Севастополя действие хронического загрязнения выражается и в замедлении их темпов роста, когда в результате постоянных энергетических затрат, необходимых для обезвреживания ксенобиотиков, энергетические траты на процессы роста снижаются [148]. Так, было показано, что бычок-кругляк из Арабатского залива Азовского моря превосходит черноморского по длине и массе тела, массе гонад и печени, по величине ГСИ (у самок) и упитанности. Выявленные особенности свидетельствуют о более благоприятных экологических условиях для жизни и размножения бычка-кругляка в юго-западной части Азовского моря.

Таким образом, комплекс представленных в работе показателей бычка-кругляка можно рекомендовать в качестве биомаркеров для оценки состояния рыб и проведения экотоксикологической оценки качества вод разнотипных водных объектов.

ВЫВОДЫ

1. Активность антиоксидантных (АО) ферментов эритроцитов и уровень окислительной модификации белков (ОМБ) сыворотки крови бычка-кругляка можно рекомендовать в качестве биомаркеров для оценки состояния рыб и среды их обитания с учетом возрастных, половых и сезонных особенностей состояния тестируемых показателей.

2. Активность АО ферментов крови бычка-кругляка из севастопольских акваторий (КАТ, ГР) и юго-западной части Азовского моря (СОД, ГР) снижалась в 1,5-2 раза у 3-х годовалых рыб по сравнению с 1-2-х летними. Содержание окисленных форм белков увеличено в сыворотке крови рыб старших возрастных групп из прибрежной зоны Севастополя.

3. Половые различия между биомаркерами крови бычка-кругляка из прибрежной зоны Севастополя характеризовались снижением активности КАТ и СОД в 1,3-2 раза и увеличением содержания окисленных форм белков в крови самцов рыб.

4. Активность большинства АО ферментов увеличивалась в крови самок и самцов бычка-кругляка из прибрежных районов Севастополя и юго-западной части Азовского моря в преднерестовый и нерестовый периоды. В севастопольских бухтах у самцов бычка-кругляка по сравнению с самками во время нереста активность ферментов достоверно снижена: СОД в 2 раза, КАТ – в 1,3 и ГТ – в 5 раз.

5. Сезонные различия показателей крови характеризовались увеличением активности АО ферментов эритроцитов крови бычка-кругляка из севастопольских акваторий весной – в 1,7-8 раз (СОД, КАТ, ГР, ГТ) и Арабатского залива Азовского моря летом – в 1,3-1,7 раза (СОД, ПЕР). Установлено снижение активности КАТ, ГР и ГТ летом (в 1,4-3,8 раза) и увеличение содержания окисленных форм белков в сыворотке крови рыб из севастопольских акваторий летом и осенью.

6. Содержание продуктов ОМБ в сыворотке крови выше у рыб из загрязненных акваторий, тогда как отклики АОС имеют неоднозначный характер. В зависимости от уровня и характера загрязнения установлены адаптивные ответные реакции, характеризующиеся повышением активности ферментов, и токсические, выражающиеся в ингибировании ферментативной активности в крови рыб из наиболее загрязненных акваторий, таких, как б. Стрелецкая.

7. Выявлена корреляционная зависимость между биомаркерами крови и концентрацией токсичных элементов в мышечной ткани бычка-кругляка из побережья Севастополя. Наиболее чувствительными к содержанию токсичных элементов в мышцах рыб являются СОД ($0,87 < r < 0,99$; $-0,54 < r < -0,76$) и ПЕР ($0,50 < r < 0,72$; $-0,84 < r < -0,98$), тогда как наибольшее влияние на активность АО ферментов и процессы ОМБ оказывали Pb, Hg и Zn.

8. Сокращение количества белковых компонентов, увеличение количества диффузных фракций и подвижности альбумина установлено в ЭФ-спектрах бычка-кругляка из более загрязненных районов.

9. Значения размерно-массовых и морфофизиологических параметров снижены, тогда как активность АО ферментов и накопление окисленных форм белков увеличены в крови бычка-кругляка из тестируемых акваторий в двух морях в 2011-2012 гг. по сравнению с соответствующими показателями рыб в 2003 г.

10. Высокий уровень комплексного загрязнения севастопольских акваторий оказывает определяющее влияние на состояние молекулярных защитных систем, а хронический характер загрязнения – на размерно-массовые характеристики рыб. У бычка-кругляка из Арабатского залива Азовского моря в 2003 г. эти параметры в большей степени зависели от природных факторов, тогда как в 2011-2012 гг. ухудшение экологической обстановки в этом регионе существенно повлияло на тестируемые показатели.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АО – антиоксидантный

АОС – антиоксидантная система

АФК – активные формы кислорода

БПК₅ – биологическое потребление кислорода (5 суток)

ГП - глутатионпероксидаза

ГР – глутатионредуктаза

ГТ – глутатион-S-трансфераза

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

КАТ – каталаза

Кэф – коэффициент электрофоретической подвижности

МОГ – монооксигеназа

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ОМБ – окислительная модификация белков

ПДК – предельно-допустимые концентрации

ПЕР – пероксидаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПХБ – полихлорированные бифенилы

РНК - рибонуклеиновая кислота

СОД – супероксиддисмутаза

СПАВ – синтетические поверхностно-активные вещества

СРО – свободнорадикальное окисление

ЭФ - электрофоретический

GSH – глутатион

Нб – гемоглобин

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамова Л.Г. Исследование белкового состава сыворотки крови растительноядных рыб / Л.Г. Адамова, Г.Г. Новиков // Физиология и биохимия животных. – 1973. - № 5. – С. 44–49.
2. Акимова Т.А. Основы экоразвития / Т.А. Акимова, В.В. Хаскин. – Москва : Российская экономическая академия, 1994. – 312 с.
3. Активация перекисного окисления при миграционном стрессе у горбуши: возможный механизм адаптации / Е.М. Крепс, В.А. Тюрин, Н.В. Горбунов [и др.] // Доклады АН СССР. – 1986. – Т. 286, № 4. – С. 1009–1012.
4. Активность систем антиоксидантной защиты и детоксикации у азовской тарани (*Rutilus rutilus*) в нерестовый период / Л.А. Бугаев, И.Л. Левина, А.В. Войкина [и др.] // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов : материалы III междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов, 22–26 июня 2010 г. – Петрозаводск, 2010. – С. 16–17.
5. Активність глутатіонзалежної антиоксидантної системи печінки і крові щурів залежно від γ -опромінення та раціону харчування / В.Ю. Нікітченко, В.І. Падалко, В.М. Ткаченко [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 66–73.
6. Алешко С.А. Сезонные изменения некоторых параметров биотрансформации и антиоксидантной системы в печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива Японского моря / С.А. Алешко, О.Н. Лукьянова // Биология моря. – 2008. – Т. 34, № 2. – С. 148–151.
7. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / под ред. Ю.А. Грызунова, Г.Е. Добрецова. - Москва : ИРИУС, 1994. – 226 с.
8. Андреева А.М. Структурно-функциональная организация альбуминовой системы крови рыб / А.М. Андреева // Вопросы ихтиологии. – 1999. – Т. 39, № 6. – С. 835–832.

9. Андреева А.М. Сывороточные пероксидазы рыб / А.М. Андреева // Вопросы ихтиологии. – 2001. – Т. 41, № 1. – С. 113–121.
10. Арчаков А.И. Модификация белков активным кислородом и их распад / А.И. Арчаков, Н.М. Мохосеев // Биохимия. – 1989. – Вып. 2. – С. 179–186.
11. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа / В.С. Асатиани. – Москва : Наука, 1969. – 611 с.
12. Багнюкова Т.В. Сезонные изменения некоторых физиолого-биохимических и морфологических показателей султанки *Mullus barbatus ponticus* Essipov / Т.В. Багнюкова, О.С. Русинова, В.И. Луцак // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т. 36, № 3. – С. 23–30.
13. Бакл Д. Гормоны животных / Д. Бакл. - Москва : Мир, 1986. – 70 с.
14. Барабой В.А. Механизм стресса и перекисное окисление липидов / В.А. Барабой // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, вып. 6. – С. 923–931.
15. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М.В. Биленко. - Москва : Медицина, 1989. – 368 с.
16. Биоиндикация экологического состояния морских акваторий с помощью биомаркеров рыб / И.И. Руднева, Е.Н. Скуратовская, И.И. Дорохова [и др.] // Водные ресурсы. – 2011. – Т. 38, № 1. – С. 92–97.
17. Биомониторинг прибрежных вод Черного моря / И.И. Руднева, Н.Ф. Шевченко, И.Н. Залевская [и др.] // Водные ресурсы. – 2005. – Т. 32, № 2. – С. 238–246.
18. Блага О.М. Екологічна характеристика та жирнокислотний склад зообентосу ставів / О.М. Блага, Й.Ф. Рівіс // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин УААН, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – 2006. – Вип. 7, № 1–2. – С. 201–205.
19. Борвинская Е.В. Влияние минерального загрязнения на активность глутатион S-трансферазы у рыб / Е.В. Борвинская, И.В. Суховская, Л.П. Смирнов // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов : материалы III междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов, 22–26 июня 2010 г. – Петрозаводск, 2010. – С. 12–13.

20. Борвинская Е.В. Глутатион-S-трансферазы рыб – потенциальные эколого-биохимические индикаторы антропогенного воздействия на водную среду (обзор) / Е.В. Борвинская, Л.П. Смирнов, Н.Н. Немова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2009. - № 3. – С. 8–19.
21. Брюханов А.Л. Каталаза и супероксиддисмутаза: распространение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов / А.Л. Брюханов, А.И. Нетрусов // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 9. – С. 1170–1186.
22. Бурлакова Е.Б. Антиоксиданты вчера, сегодня, завтра / Е.Б. Бурлакова // Свободные радикалы и антиоксиданты в химии и биологии: юбилейная конф., 29 сент., 2 – 4 окт. 2000 г. : тез. докл. – Москва, 2000. – С. 147–149.
23. Вахтина Т.Б. Влияние долговременного антропогенного загрязнения на белковый состав сыворотки крови бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus*), обитающего в прибрежной части Черного моря / Т.Б. Вахтина, И.И. Руднева // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов - 2 : расширенные материалы междунар. науч.-практ. конф., Борок, 17–20 июля 2007 г. : тез. докл. – Москва, 2007. – С. 123–126.
24. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – Москва : Наука, 1972. – 252 с.
25. Владимиров Ю.А. Лекции по медицинской биофизике : учебное пособие / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина. – Москва : Изд-во МГУ ; ИКЦ «Академкнига», 2007. – 432 с.
26. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и патология клетки / Ю.А. Владимиров. – Москва : Общество «Знание» РСФСР, 1979. – 46 с.
27. Влияние условий существования на связывание тяжелых металлов и окислительную деструкцию биомолекул в тканях пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* / О.Б. Столяр, В.В. Грубинко, Р.Л. Михайлив [и др.] // Гидробиологический журнал. – 2003. – Т. 39. № 6. – С. 73–82.
28. Воскресенский О.Н. О связях адаптогенного и антиоксидантного действия / О.Н. Воскресенский // Адаптация и адаптогены. – Владивосток, 1977. – С. 91–96.

29. Гавлена Ф.К. Каспийский бычок-кругляк в Куйбышевском водохранилище / Ф.К. Гавлена // Рыбоводство и рыболовство. – 1971. – № 3. – С. 27.
30. Голованова И.Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных / И.Л. Голованова // Биология внутренних вод. – 2008. – № 1. – С. 99–108.
31. Гостюхина О.Л. Состояние системы антиоксидантной защиты в тканях черноморской камбалы-калкан в период нереста / О.Л. Гостюхина, И.В. Головина // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 5. – С. 104–110.
32. Губанов Е.П. Черное море вызывает о помощи / Е.П. Губанов // Крымские известия, 15 ноября. – 2005 г.
33. Добрецов Г.Е. Введение. Биохимия и физико-химия сывороточного альбумина. Центры связывания органических молекул // Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Г.Е. Добрецов, Ю.И. Миллер. – Москва, 1994. – С. 13–28.
34. Дорохова И.И. Особенности эндогенной интоксикации в тканях морского ерша / И.И. Дорохова // Человек и животные : материалы V междунар. науч.-практ. конф., 14-16 мая 2010 г. : тез. докл. – Астрахань, 2010. – С. 45–47.
35. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота / Д.Б. Зоров, С.Ю. Банникова, В.В. Белоусов [и др.] // Биохимия. – 2005. – Т. 70, вып. 2. – С. 265–272.
36. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков / Е.Е. Дубинина, И.В. Шугалей // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 1. – С. 71–81.
37. Замбриборщ Ф.С. О современных тенденциях изменений черноморских ихтиоценозов / Ф.С. Замбриборщ // Вопросы ихтиологии. – 1985. – Т. 25, вып. 4. – С. 685–690.
38. Зенков Н.К. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – Москва, 2001. – 343 с.
39. Ипатов В.В. Сывороточные белки рыб: гетерогенность, структура и функции / В.В. Ипатов, В.И. Лукьяненко // Успехи современной биологии. – 1979. – Т. 88, вып. 1 (4). – С. 108–124.

40. Калиман П.А. Гемоксигеназная активность в печени крыс разного возраста при оксидативном стрессе / П.А. Калиман, И.В. Никитченко // Биологические механизмы старения: VI междунар. симпоз., 26–29 мая, 2004 г. : тез. докл. – Харьков, 2004. – С. 20.
41. Калинина Э.М. Нерест и распределение личинок литофильных рыб из семейства Gobiidae и Blenniidae // Размножение и экология массовых рыб Черного моря на ранних стадиях онтогенеза / Э.М. Калинина. – Киев, 1970. – С. 88–111.
42. Калинина Э.М. Размножение и развитие азово-черноморских бычков / Э.М. Калинина. – Киев : Наук. думка, 1976. – 120 с.
43. Карнаухов Г.И. Гаптоглобины у некоторых рыб Дальневосточного комплекса / Г.И. Карнаухов // Информационный бюллетень Института биологии внутренних вод АН СССР. – 1987. - № 76. – С. 53–55.
44. Карпевич М.Ф. Изменение структуры и биопродуктивности водных экосистем / М.Ф. Карпевич // Вопросы ихтиологии. – 1985. – Т. 25, вып. 1. – С. 3–16.
45. Карякина Е.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е.В. Карякина, С.В. Белова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 3. – С. 3–8.
46. Кирюхина Л.Н. Химическая и микробиологическая характеристика донных осадков севастопольских бухт в 2003 г. / Л.Н. Кирюхина, О.Г. Миронов // Экология моря. – 2004. – Вып. 66. – С. 53–58.
47. Ковыршина Т.Б. Исследования долговременных изменений активности антиоксидантных ферментов крови азовского бычка-кругляка в зависимости от содержания токсичных элементов в его тканях / Т.Б. Ковыршина, Д.А. Болдырев, С.О. Омельченко // Ветеринарна медицина : межвід. темат. наук. зб. - 2012. – Вип. 96. – С. 294–296.
48. Ковыршина Т.Б. Отклики биохимических маркеров крови на содержание токсичных элементов в тканях бычка-кругляка из Черного и Азовского морей / Т.Б. Ковыршина, С.О. Омельченко // Рыбное хозяйство Украины. – 2010. – № 3. – С. 7–10.

49. Коржов В.И. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты (обзор литературы) / В.И. Коржов, В.Н. Жадан, М.В. Коржов // Журнал академии медицинских наук Украины. – 2007. – Т. 13, № 1. – С. 3–19.
50. Костюченко В.А. Возраст и темп роста бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas)) в Азовском море / В.А. Костюченко // Труды Азовского научно-исследовательского института рыбного хозяйства. – 1961. – Вып. 19. – С. 49–60.
51. Короткина Р.Н. Сравнительное исследование активности ферментов обмена глутатиона и антиоксидантных ферментов в злокачественных и доброкачественных опухолях легких человека / Р.Н. Короткина, Г.Н. Мацкевич, А.Ш. Девмеканова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, № 6. – С. 697–701.
52. Красновид И.И. Экологическое состояние внутренних морских вод г. Севастополя / И.И. Красновид, Б.А. Озюменко // Сборник научных работ специалистов санитарно-эпидемиологической службы Севастополя. – Севастополь, 2002. – Вып. 7. – С. 26–33.
53. Кузьмина С.А. О некоторых биохимических свойствах крови судака Курского залива : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 102 физиология рыб / С.А. Кузьмина. – Калининград, 1968. – С. 10–17.
54. Кузьминова Н.С. Оценка токсичного действия хозяйственно-бытовых сточных вод на морские организмы : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Наталья Станиславовна Кузьминова. – Москва, 2006. – 168 л.
55. Кузьминова Н.С. Состояние трехусого морского налима *Gaidropsarus mediterraneus* (L.) (Gadiidae), обитающего в севастопольских бухтах с разным уровнем загрязнения / Н.С. Кузьминова, Е.Н. Скуратовская // Рыбное хозяйство Украины. – 2011. – № 1. – С. 3–9.
56. Куликова Н.И. О сезонной динамике белкового состава сыворотки крови бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pallas) Азовского моря / Н.И. Куликова

// Труды Азово-Черноморского научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии. – 1969. – Вып. 26. – С. 134–142.

57. Куликова Н.И. Электрофоретическое исследование белков сыворотки крови «крупной» и «мелкой» ставрид Черного моря / Н.И. Куликова // Труды АзчерНИРО. – 1964. – Вып. 22 : Вопросы физиологии рыб Черного и Азовского морей. – С. 73–74.

58. Кульчитский О.К. Особенности пероксидного окисления липидов в тканях головного мозга и печени старых крыс при стрессе / О.К. Кульчитский, Р.И. Потапенко, С.Н. Новикова // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 4. – С. 73–77.

59. Лав Р.М. Химическая биология рыб / Р.М. Лав. – Москва : Пищевая промышленность, 1976. – 262 с.

60. Лавровская Н.Ф. Современные исследования по биохимии рыб / Н.Ф. Лавровская. – Москва : ЦНИИТЭИРХ, 1973. – 99 с.

61. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – Москва : Высшая школа, 1990. – 352 с.

62. Ландау М.А. Молекулярные механизмы действия физиологически активных соединений / М.А. Ландау. – Москва : Наука, 1981. – 262 с.

63. Литвинова Н.Н. О сезонных соотношениях белковых фракций сыворотке крови донского судака / Н.Н. Литвинова // Биологические науки. – 1968. – № 10. – С. 35–38.

64. Литвин Ф.Ф. Практикум по физико-химическим методам в биологии / Ф.Ф. Литвин. – Москва, 1981. – С. 86–87.

65. Лукьяненко В.И. Альбуминовая система сыворотки крови разных по экологии видов осетровых рыб / В.И. Лукьяненко, М.В. Хабаров. – Ярославль, 2005. – 232 с.

66. Лукьяненко В.И. Экологическая биохимия рыб / В.И. Лукьяненко // Экологическая физиология и биохимия рыб. – Астрахань, 1979. – Т. 1. – С. 25–28.

67. Лукьяненко В.И. Белковый спектр сыворотки крови у различных возрастных групп белуги (*Huso huso* L.) / В.И. Лукьяненко, А.В. Попов, Э.А.

Мишин // Известия Академии наук СССР. Серия: Биологическая. – 1971. - № 3. – С. 428–433.

68. Лукьяненко В.И. Гаптоглобины рыб // Физиология и биохимия низших позвоночных / В.И. Лукьяненко, А.В. Попов. - Ленинград, 1974. – С. 3–8.

69. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Лушак // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 8. – С. 995–1017.

70. Магомедов С.К. Некоторые аспекты патогенеза при содержании рыб в различных осмотических условиях / С.К. Магомедов, В.И. Чернышов, А.Р. Исуев // Биоантиокислители и регуляция окислительных процессов в клетке : материалы симпоз., 6-9 июня 1972 г. – Москва, 1972. – С. 55–56.

71. Маклакова М.Е. Иммуно-физиологический статус у рыб из природных популяций и аквакультуры в норме и при патологии : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.06 / М.Е. Маклакова. – Москва, 2012. – 25 с.

72. Мартемьянов В.И. Стресс у рыб: защитные и повреждающие процессы / В.И. Мартемьянов // Биология внутренних вод. – 2002. – № 4. – С. 3–13.

73. Матишов Г.Г. К проблеме вредоносных «цветений воды» в Азовском море [Электронный ресурс] / Г.Г. Матишов, Т. В. Фуштей // Электронный журнал «Исследовано в России». – 2003. – С. 213–225. – Режим доступа : <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/022/pdf.-2003>.

74. Меерсон Ф.З. Роль стресса в механизме долговременной адаптации и профилактика стрессорных повреждений / Ф.З. Меерсон // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1980. - № 5. – С. 3–15.

75. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 3. – С. 442–445.

76. Микодина Е.В. Физиолого-биохимические исследования функционального гомеостаза рыб / Е.В. Микодина, М.И. Шатуновский // Вопросы ихтиологии. – 2013. – Т. 53, № 1. – С. 113–118.

77. Микряков В.Р. Характеристика показателей перекисного окисления липидов в системе паразит – хозяин на примере *Ligula intestinalis* L. (Cestoda, Hseudophyllidea) – *Abramis brama* L. / В.Р. Микряков, Н.И. Силкина // Биология внутренних вод. – 2006. - № 4. – С. 63–66.
78. Морозов А.А. Особенности механизмов антиоксидантной системы некоторых пресноводных видов рыб из рыбинского водохранилища / А.А. Морозов, Г.М. Чуйко // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов : материалы III междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов, 22 – 26 июня 2010 г. : тез. докл. – Петрозаводск, 2010. – С. 121–123.
79. Москалькова К.И. Экологические и морфо-физиологические предпосылки к расширению ареала у бычка-кругляка *Neogoobius melanostomus* в условиях антропогенного загрязнения водоемов / К.И. Москалькова // Вопросы ихтиологии. – 1996. – Т. 36, №5. – С. 615–621.
80. Найденова Н.Н. Зависимость паразитофауны бычков от сезона года / Н.Н. Найденова // Биология моря. – 1976. – Вып. 36. – С. 91–96.
81. Немова Н.Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб / Н.Н. Немова. – Москва : Наука, 2005. – 165 с.
82. Немова Н.Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н.Н. Немова, Р.У. Высоцкая. – Москва : Наука, 2004. – 216 с.
83. Нефедов Г.Н. Сывороточные гаптоглобины морских окуней рода *Sebastes* / Г.Н. Нефедов // Вестник Московского государственного университета. – 1969. – Сер. IV, вып. 1. – С. 104–108.
84. Овен Л.С. Ответные реакции морского ерша *Scorpaena porcus* на антропогенное воздействие / Л.С. Овен, И.И. Руднева, Н.Ф. Шевченко // Вопросы ихтиологии. – 2000. – Т. 40, № 1. – С. 75–78.
85. Овен Л.С. О нарушениях гонадо- и гаметогенеза у черноморской ставриды / Л.С. Овен, Т.В. Багнюкова // Современное состояние ихтиофауны Черного моря. – Севастополь, 1996. – С. 68–74.

86. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина, С.В. Гавровская, Е.В. Кузьмич [и др.] // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 3. – С. 413–421.
87. Олексюк Н.П. Активність про- і антиоксидантних систем у печінці прісноводних риб у різні пори року / Н.П. Олексюк, В.Г. Янкович // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 3. – С. 41–47.
88. Омельченко С.О. Состояние азотистого обмена рыб в условиях загрязнения нитрозаминами и токсичными элементами : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Светлана Олеговна Омельченко. - Симферополь, 2009. – 162 с.
89. Омельченко С.О. Содержание токсичных элементов в тканях бычка-кругляка, обитающего в акваториях Черного и Азовского морей / С.О. Омельченко, И.Н. Залевская // Ученые записки Таврического национального университета. – 2006. – Т. 19 (58), № 1. – С. 68–72.
90. Остроумова И.Н. Белковый состав сыворотки крови лососевых рыб // Обмен веществ и биохимия рыб / И.Н. Остроумова. – Москва, 1967. – С. 283–290.
91. Оценка благополучия рыбной части водного сообщества по результатам морфологического анализа рыб / Ю.С. Решетников, О.А. Попова, Н.А. Кашулин [и др.] // Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, вып. 2. – С. 165.
92. Оценка микробного загрязнения морской воды и массовых видов рыб прибрежной части Черного и Азовского морей / Г.В. Симчук, В.Л. Зубаченко, С.О. Омельченко [и др.] // Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія. – 2005. – Т. 10. – Вып. 7. – С. 201–207.
93. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей / И.А. Переслегина // Лабораторное дело. – 1989. - № 11. – С. 20–23.
94. Петренко О.А. Антропогенное загрязнение экосистемы Азовского моря / О.А. Петренко, И.Д. Кудрик // Рыбное хозяйство Украины. – 2010. – № 2. – С. 46–50.
95. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб / И.Ф. Правдин. – М. : Пищ.

пром., 1966. – 376 с.

96. Применение биомаркеров крови рыб для экотоксикологической оценки прибрежных морских акваторий / И.И. Руднева, Е.Н. Скуратовская, С.О. Омельченко [и др.] // Экологическая химия. – 2010. – Т. 17, вып. 2. – С. 77–84.

97. Расс Т.С. Рыбные ресурсы Черного моря и их изменения / Т.С. Расс // Океанология. – 1992. – Т. 32, вып. 2. – С. 293–302.

98. Расщеперин В.К. Особенности порционного икротетания бычка-кругляка Азовского моря и численность его молоди / В.К. Расщеперин // Труды Совещания молодых ученых. – Москва, 1964. – С. 70–74.

99. Решетников Ю.С. Сезонные изменения белкового состава сыворотки крови и жирности сигов / Ю.С. Решетников, Л.П. Паранюшкина, В.И. Кияшко // Вопросы ихтиологии. – 1970. – Т. 10, вып. 6 (65). – С. 1065–1078.

100. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопалов [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 110–116.

101. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно-радикальному окислению / И.В. Сорокина, А.П. Крысин, Т.Б. Хлебникова [и др.] // Аналитический обзор. – Новосибирск : СО РАН, ГПНТБ, 1997. – Вып. 46. – 68 с.

102. Руднева И.И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы у рыб и процессов перекисного окисления липидов / И.И. Руднева // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, № 4. – С. 391–400.

103. Руднева И.И. Загрязнение, контроль, анализ и охрана экологических систем / И.И. Руднева // Экологические системы и приборы. – 2010. – № 2. – С. 3–11.

104. Руднева И.И. Ответные реакции морских животных на антропогенное загрязнение Черного моря : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.29 / Ирина Ивановна Руднева. – Москва, 2000. – 357 л.

105. Руднева И.И. Эколого-филогенетические особенности липидного состава и процессов перекисного окисления липидов у хрящевых и костистых рыб Черного

- моря / И.И. Руднева // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1998. – Т. 34, № 3. – С. 310–318.
106. Руднева И.И. Влияние антропогенного загрязнения на биохимические показатели черноморских рыб / И.И. Руднева // Современное состояние ихтиофауны Черного моря. – Севастополь, 1996. – С. 168–188.
107. Руднева И.И. Изменение белкового состава крови черноморского бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* Pallas при действии различных доз гамма-облучения / И.И. Руднева. – Севастополь, 1986. – 19 с.
108. Руднева И.И. Применение биомаркеров рыб для экотоксикологической диагностики водной среды / И.И. Руднева // Рыбное хозяйство Украины. – 2006. – № 1. – С. 20–23.
109. Руднева И.И. Изменение состава сывороточных преальбуминов рыб как ответная реакция на хроническое загрязнение морской среды / И.И. Руднева, Т.Б. Вахтина, И.Н. Залевская // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2 : расширенные материалы Междунар. науч.-практ. конф., Борок, 17–20 июля 2007 г. – Москва, 2007. – С. 230–233.
110. Руднева И.И. Действие полихлорированных бифенилов на антиоксидантную систему и перекисное окисление липидов в гонадах черноморской султанки *Mullus barbatus ponticus* / И.И. Руднева, Н.В. Жерко // Биология моря. – 1999. – Т. 25, № 3. – С. 239–242.
111. Руднева И.И. Роль молекулярных систем в защитных реакциях рыб, зараженных паразитами / И.И. Руднева, А.В. Завьялов, Е.Н. Скуратовская // Рыбное хозяйство Украины. – 2010. – № 1 (66). – С. 2–6.
112. Руднева И.И. Влияние паразитарной инвазии на активность некоторых антиоксидантных ферментов печени и мышц хозяина черноморского калкана *Psetta maxima maeotica* / И.И. Руднева, А.И. Солоноченко, Е.Б. Мельникова // Паразитология. – 2004. – Т. 38, вып. 6. – С. 557–561.
113. Руднева І.І. Порівняльна характеристика білкового складу сироватки крові деяких видів чорноморських риб / І.І. Руднева, Д.О. Соркіна // III Український біохімічний з'їзд, 1977 р. : тези стендових повід. – Донецьк, 1977. – С. 296–297.

114. Руднева И.И. Половые особенности активности антиоксидантных ферментов крови некоторых прибрежных видов рыб Черного моря / И.И. Руднева, Е.Н. Скуратовская // Вопросы ихтиологии. – 2009. – Т. 49, № 1. – С. 125–128.
115. Рыбина Г.Е. Токсичность буровых шламов разного состава нефтепромыслов Западной Сибири для пресноводных гидробионтов : автореф. дис. ... канд. биол. наук. : 03.00.18 / Галина Евгеньевна Рыбина. - Борок, 2004. – 21 с.
116. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря / А.Н. Световидов – Ленинград : Наука, 1964. – 550 с.
117. Селективність металотіонеїнів печінки коропа у зв'язуванні іонів металів та антиоксидантний захист організму за дії суміші міді, цинку, марганцю і свинцю / О.Б. Столяр, А.Є. Мудра, Н.Г. Зінковська [та ін] // Доповіді Національної академії наук України. – 2004. – № 5. – С. 184–189.
118. Сен А. Биохимическая характеристика и распределение глутатион-S-трансфераз у остроноса (*Liza saliens*) / А. Сен, А. Кирикбакан // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 9. – С. 1223–1227.
119. Сказкина Е.П. Особенности дыхания бычковых Азовского моря / Е.П. Сказкина // Тезисы докладов Всесоюзного совещания по экологической физиологии рыб. – Москва, 1966. – С. 56–58.
120. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный. - Москва : Издательский дом „ОНИКС 21 век” ; Мир, 2004. – 216 с.
121. Скуратовская Е.Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Екатерина Николаевна Скуратовская. – Севастополь, 2009. – 148 л.
122. Скуратовская Е.Н. Тканевая специфичность активности антиоксидантных ферментов некоторых видов черноморских рыб / Е.Н. Скуратовская, Н.С. Кузьминова // Заповедники Крыма – 2007 : Оценка потребностей сохранения биоразнообразия Крыма : материалы IV междунар. науч.-практ. конф. (2 ноября 2007 г.). – Симферополь, 2007. – Ч. 2: Зоология. – С. 190–197.

123. Скуратовская Е.Н. Влияние паразитарной инвазии на состояние антиоксидантной ферментативной системы крови мерланга (*Merlangus merlangus euxinus*) / Е.Н. Скуратовская, А.В. Завьялов // Ветеринарна медицина : межвід. темат. наук. зб. – 2008. – Вип. 90. – С. 394–399.
124. Скуратовская Е.Н. Влияние паразитарной инвазии на активность некоторых антиоксидантных ферментов тканей черноморского шпрота (*Sprattus sprattus phalericus* R.) / Е.Н. Скуратовская, А.В. Завьялов // Рыбное хозяйство Украины. – 2006. - № 5–6. - С. 54–55.
125. Скуратовская Е.Н. Межгодовая динамика активности антиоксидантных ферментов крови морского ерша, отловленного в Севастопольской бухте / Е.Н. Скуратовская, И.И. Руднева, С.О. Омельченко // Экологические системы и приборы. – 2010. - № 12. – С. 53–57.
126. Скуратовская Е.Н. Экотоксикологический анализ морского ерша *Scorpaena porcus* L. из разных бухт г. Севастополя / Е.Н. Скуратовская, Т.Э. Хмеленко // Современные проблемы биологии, экологии и химии : III междунар. науч.-практ. конф. – Запорожье, 2012. – С. 277–279.
127. Современное состояние и тенденции изменения экосистемы Севастопольской бухты / Е.В. Павлова, Е.И. Овсяный, А.Д. Гордина [и др.] // Акватории и берега Севастополя: экосистемные процессы и услуги обществу. – Севастополь, 1999. – С. 70–95.
128. Современное состояние ихтиофауны Черного моря. – Севастополь : «ЭКОСИ-Гидрофизика», 1996. – 214 с.
129. Содержание тяжелых металлов в тканях некоторых черноморских рыб и их влияние на уровень окислительной модификации белков / С.О. Омельченко, Ю.А. Граб, И.Н. Залевская [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия “Биология, химия”. – 2007. – Т. 20 (59), № 3. – С. 59–64.
130. Соколов Л.И. Ихтиофауна реки Москвы в черте г. Москвы и некоторые данные о ее состоянии / Л.И. Соколов, Л.И. Соколова, В.А. Пегасов // Вопросы ихтиологии. – 1994. – Т. 34, № 5. – С. 364–641.

131. Соколовский В.В. Возрастные особенности состояния антиоксидантной системы белых крыс / В.В. Соколовский, В.Г. Макаров, В.М. Тимофеева // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1988. – № 5. – С. 771–774.
132. Солдатов А.А. Гемоглобиновая система черноморского бычка-кругляка в условиях экспериментальной гипоксии / А.А. Солдатов, И.А. Парфенова, С.В. Коношенко // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 3. – С. 85–90.
133. Сополева Н.Н. Экологическое состояние Севастопольского региона / Н.Н. Сополева // Открытое общество : материалы междунар. конф., окт. 1998, Севастополь. – Севастополь, 1998. – С. 56–68.
134. Сорвачев К.Ф. Изменения белков сыворотки крови карпа во время зимовки / К.Ф. Сорвачев // Биохимия. – 1957. – Т. 22, вып. 5. – С. 872–877.
135. Соркина Д.А. Сравнительная характеристика белковых и липопротеидных спектров сыворотки крови черноморских рыб / Д.А. Соркина, И.И. Руднева // Труды Крымского медицинского института. – 1975. – Т. 66, вып. 1. – С. 61–63.
136. Соркина Д.А. Структурно-функциональные свойства белков / Д.А. Соркина, И.Н. Залевская. – Киев : Выща школа, 1990. – 210 с.
137. Столяр О.Б. Роль металотіонеїнів в детоксикації йонів міді, цинку, марганцю та свинцю в організмі прісноводних риб і молюсків : автореф. дис. ... д-ра біол. наук : 03.00.04 / Оксана Борисівна Столяр. – Львів, 2004. – 33 с.
138. Троицкая О.В. Современные методы в биохимии / О.В. Троицкая. - Москва, 1977. – С. 66–68.
139. Фальфушинська Г.І. Кумуляція міді, цинку, марганцю і свинцю в металотіонеїнах та інших клітинних компонентах тканин рака за забруднення ними водного середовища / Г.І. Фальфушинська, М.М. Касянчук, О.Б. Столяр // Наук. Зап. Тернопіль. пед. ун-ту. Сер. Біологія. – Тернопіль, 2003. – № 3–4 (22). – С. 105–109.
140. Филенко О.Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды / О.Ф. Филенко // Экологические системы и приборы. – 2007. – № 6. – С. 18–20.

141. Харрис Г. Основы биохимической генетики человека / Г. Харрис. – Москва : Мир, 1973. – 327 с.
142. Холод В.М. Белки сыворотки крови в клинической и экспериментальной ветеринарии / В.М. Холод. – Минск : «Ураджай», 1983. – 76 с.
143. Хочачка П. Стратегия биохимической адаптации / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – Москва : Мир, 1977. – 398 с.
144. Хубларян М.Г. Качество воды / М.Г. Хубларян, Т.И. Моисеенко // Вестник Российской академии наук. – 2009. – Т. 79, № 5. – С. 403–410.
145. Цехмістренко С.І. Вікові особливості функціонування системи антиоксидантного захисту крові страусів / С.І. Цехмістренко, В.М. Поліщук // Укр. біохім. журн. – 2010. – Т. 82, № 5. – С. 92–97.
146. Чепурнов А.В. Изменения в составе липидов самок и самцов черноморского бычка-кругляка в период нереста и раннего онтогенеза / А.В. Чепурнов, Н.К. Ткаченко // Биохимические и эколого-физиологические исследования рыб и беспозвоночных : материалы всесоюз. симпоз. по изученности Черного и Средиземного морей, использованию и охране их ресурсов, октябрь 1973 г., г. Севастополь : тез. докл. – Киев, 1973. – Ч. 2. – С. 212–216.
147. Чесалина Т.Л. Токсическое действие соляра на молодь черноморской кефали-остроноса *Liza saliens* / Т.Л. Чесалина, И.И. Руднева, Н.С. Кузьминова // Вопросы ихтиологии. – 2000. – Т. 40, № 3. – С. 429–432.
148. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб / М.И. Шатуновский. – Москва : Наука, 1980. – 283 с.
149. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб / Г.Е. Шульман. – Москва : Пищевая промышленность, 1972. – 368 с.
150. Шульман Г.Е. Проблемы экологической физиологии и биохимии рыб / Г.Е. Шульман // Гидробиологический журнал. – 1985. – Т. 21, № 1. – С. 49–56.
151. Шульман Г.Е. О специфичности белкового состава сыворотки крови рыб / Г.Е. Шульман, Н.И. Куликова // Успехи современной биологии. – 1966. – Т. 62, вып. 1 (4). – С. 42–60.

152. Шульман Г.Е. Основные черты метаболизма рыб Азово-Черноморского и Средиземноморского бассейнов / Г.Е. Шульман // Биохимические и эколого-физиологические исследования рыб и беспозвоночных : материалы всесоюз. симпоз. по изученности Черного и Средиземного морей, использованию и охране их ресурсов, октябрь 1973 г., г. Севастополь : тез. докл. – Киев, 1973. – Ч. 2. – С. 217–219.
153. Шульц Г. Принципы структурной организации белков / Г. Шульц, Р. Ширмер. – Москва : Мир, 1982. – 351 с.
154. Экологическая оценка современного состояния вод в районе взаимодействия Севастопольской бухты с прилегающей частью моря / Е.А. Куфтакова, В.И. Губанов, Н.П. Ковригина [и др.] // Морской экологический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 72–91.
155. Экологическое состояние вод юго-западной части Азовского моря / И.И. Руднева, Т.Б. Вахтина, Н.П. Ковригина [и др.] // Современные проблемы экологии Азово-Черноморского региона : материалы конф., 10-11 окт. 2007 г. : тез. докл. – Керчь, 2007. – С. 102–109.
156. Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя / отв. ред. И.И. Руднева ; Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН ; Российский фонд фундаментальных исследований. – Москва : ГЕОС, 2016. – 360 с. – (Посвящается 145-летию Севастопольской биологической станции).
157. Юрченко В.В. Активность этоксирезоруфин О-деэтилазы (ЭРОД) рыб как биомаркер загрязнения водной среды стойкими органическими загрязняющими веществами / В.В. Юрченко, Г.М. Чуйко // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов : материалы III междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов, 22–26 июня 2010 г. – Петрозаводск, 2010. – С. 199–200.
158. Ababouch L. Assuring fish safety and quality in international fish trade / L. Ababouch // Marine Pollution Bulletin. – 2006. – Vol. 53, iss. 10-12. – P. 561–568.

159. Abasali H. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets / H. Abasali, S. Mohamad // Journal of Animal and Veterinary Advances. - 2010. – Vol. 9, iss. 13. – P. 1839–1847.
160. Acute effects of benzo[a]pyrene on live phase I and II enzymes, and DNA damage on sea bream *Sparus aurata* / M. Banni, Z. Bouraoui, J. Ghedira, C. Clerandau, H. Guerbej, J.F. Narbone, H. Boussette // Fish Physiology and Biochemistry. – 2009. – Vol. 35, iss. 2. – P. 293–299.
161. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata* / Z. Bouraoui, M. Banni, J. Ghedira, C. Clerandau, H. Guerbej, J.F. Narbone, H. Boussette // Fish Physiology and Biochemistry. – 2008. – Vol. 34, iss. 3. – P. 201–207.
162. Age composition and antioxidant enzyme activities in blood of Black Sea teleosts / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, N.S. Kuzminova. T.B. Kovyrshina // Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. C. – 2010. – Vol. 151, iss. 2. – P. 229–239.
163. Age-related biomarkers can be modulated by diet in the rat / H.A. MacQueen, W.S. Wassif, I. Walker, D.A. Sadler, K. Evans // Food and Nutrition Sciences. – 2011. – Vol. 2, no. 8. – P. 884–890.
164. Age-related markers assayed at different developmental stages of the annual fish *Nothobranchius rachovii* / C. Hsu, Y. Chiu, W. Hsu, Y-P Chan // Journal of Gerontology: Biological Sciences. – 2008. – Vol. 63 A, iss. 12. – P. 1267–1276.
165. Ahmad I. *Anguilla anguilla* L. Oxidative Stress Biomarkers: An in Situ Study of Freshwater Wetland Ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal) / I. Ahmad, M. Pacheco, M.A. Santos // Chemosphere. - 2006. - Vol. 65, iss. 6. - P. 952–962.
166. Almroth B.C. Oxidative damage in rainbow trout caged in a polluted river / B.C. Almroth, J. Sturve, L. Förlin // Marine Environmental Research. – 2008. – Vol. 66, iss. 1. – P. 90–91.
167. Antioxidant enzymes in *Oreochromis mossambicus* as biochemical indicators of aquatic pollution from Chromep lake at Chennai, India / S. Ganesan, C. Prabhakar, P. Saravanan, Mazher Sultana // International Journal of Resent Scientific Research. – 2011. – Vol. 2, iss. 4. – P. 91–93.

168. Antioxidant responses and plasma biochemical characteristics in the freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after acute exposure to the fungicide propiconazole / Z.-H. Li, V. Zlabek, J. Velišek, R. Grabic, J. Machová, J. Kolařová, P. Li, T. Randák // Czech Journal of Animal Science. – 2011. – Vol. 56, no. 2. – P. 61–69.
169. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene, tributyltin and their mixture in the spleen of *Sebasticus marmoratus* / Y. Q. Wu, C. G. Wang, Y. Wang [et al.] // Journal Environmental Science (China). – 2007. – Vol. 19, iss. 9. – P. 1129–1135.
170. Anguiano O.L. The role of glutathione conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides / O.L. Anguiano, A.C. de Castro, A.M. P. de D'Angelo // Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. C. – 2001. – Vol. 128, iss. 1. – P. 35–43.
171. Application fish blood biomarkers in evaluation of marine environment health / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, I.I. Dorohova, T.B. Kovyrshina // World Journal of Science and Technology. – 2012. – Vol. 2, iss. 7. – P. 19–25.
172. Arukwe A. Hepatic biotransformation responses in Atlantic salmon exposed to retinoic acids and 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB congener 77) / A. Arukwe, B. Nordbo // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 2008. – Vol. 147, iss. 3. – P. 470–482.
173. Awasthi Y. C. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase / Y. C. Awasthi, E. Beutler, S. K. Srivastava // Journal of Biological Chemistry. – 1975. – Vol. 250, no. 13. – P. 5144–5149.
174. Bagnyukova T.V. Coordinates response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress / T.V. Bagnyukova, O.I. Chahrac, V.I. Lushchak // Aquatic Toxicology. – 2006. – Vol. 78, iss. 4. – P. 325–331.
175. Bagnyukova T.V. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldenfish liver and kidney / T.V. Bagnyukova, K.B. Storey, V.I. Lushchak // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B. – 2005. – Vol. 142, iss. 3. – P. 335–341.
176. Baker M.E. Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates / M.E. Baker // Journal of Endocrinology. – 2002. – Vol. 175, no. 1. – P. 121–127.

177. Beena P. Study of tobacco habits and alteration in enzymatic antioxidant system in oral cancer / P. Beena, U.M. Patela, P.M. Rawale // *Oncology*. – 2005. – Vol. 68, no. 4-6. – P. 511–519.
178. Bell J.G. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / J.G. Bell, C.B. Cowey // *Aquaculture*. – 1989. – Vol. 81, iss. 5. – P. 61–68.
179. Bickler P.E. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability / P.E. Bickler, L.T. Buck // *Annual Review of Physiology*. – 2007. – Vol. 69. – P. 145–170.
180. Biochemical alterations in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: glutathione reductase as a target / J.L. Franco, T. Posser, J.J. Mattos [et al.] // *Marine Environmental Research*. – 2008. – Vol. 66, iss. 1. – P. 88–89.
181. Biochemical biomarkers in adult female perch (*Perca fluviatilis*) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden) / T. Hansson, D. Schiedek, K. K. Lehtonen [et al.] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2006. – Vol. 53, iss. 8-9. – P. 451 – 468.
182. Biochemical characterization of a protein of albumin multigene family from serum of African catfish *Clarias gariepinus* Bloch / A. Hasnain, R. Ahmad, M. Jabeen [et al.] // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – Vol. 41. – P. 148 – 153.
183. Biomarker Responses in European Eel (*Anguilla anguilla*) Exposed to Persistent Organic Pollutants. A Field Study in the Vaccarès Lagoon (Camargue, France) / A. Buet, D. Banas, Y. Vollaire [et al.] // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 65, iss. 10. – P. 1846–1858.
184. Biomarker studies on gold-lined sea bream (*Rhabdosargus sarba*) exposed to benzo[a]pyrene / L. Xu, J. Chen, Y. Zang [et al.] // *Water Science & Technology*. – 2001. – Vol. 43, iss. 2. – P. 155–160.
185. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects / L.L. Amando, C.E. Rosa, A.M. Leite [et al.] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2006. – Vol. 52. – P. 199–206.

186. Brown J.R. Structure of bovine serum albumin / J.R. Brown // Federation Proceedings. – 1975. – Vol. 34. – P. 591
187. Chainy G.B. Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system / G.B. Chainy, S. Samantaray, L. Samanta // Andrologia. – 1997. – Vol. 29. – P. 343–349.
188. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40) / J.P. Boon, J.M. Everaarts, M.T. Hillebrand [et al.] // Science of the Total Environment. – 1992. – Vol. 114. – P. 113–133.
189. Chiu D.T.Y. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase / D.T.Y. Chiu, F.H. Stults, A.L. Tappel // Biochemica et Biophysica Acta. – 1976. – Vol. 445, iss. 3. – P. 558–566.
190. Chromium Effects on Free Radical Processes in Goldfish Tissues: Comparison of Cr(III) and Cr(VI) Exposures on Oxidative Stress Markers, Glutathione Status and Antioxidant Enzymes / O.I. Kubrak, O.V. Lushchak, J.V. Lushchak [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 2010. – Vol. 152, iss. 3 – P. 360–370.
191. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behavior / A. A. R. Radi, D. Q. Hai, B. Matkovics [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 1985. – Vol. 81, iss. 2. – P. 395–399.
192. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species / J. Wdzieczak, G. Zalesna, E. Wujec, G. Peres // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B. – 1982. – Vol. 73, iss. 2. – P. 361–365.
193. Davies K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals (III. Modification of secondary and tertiary structure) / K.J.A. Davies, M.E. Delsignore // Journal of Biological Chemistry. – 1987. – Vol. 262, iss. 20. – P. 9908–9913.
194. Davis B.J. Disk electrophoresis. II. Method and application in human serum proteins / B.J. Davis // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1964. – Vol. 121. – P. 404.

195. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR / J. Cazenave, M. A. Bistoni, S. F. Pesce [et al.] // *Aquatic Toxicology*. – 2006. – Vol. 76, iss. 1. – P. 1–12.
196. Dose- and time-dependent formation of biliary benzo[a]pyrene metabolites in the marine flatfish dab (*Limanda limanda*) / A. Van Schanke, F. Holtz, J. P. van der Meer [et al.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2001. – Vol. 20, iss. 8. – P. 1641–1647.
197. Drilhon A. Dimorphisme sexual dans les proteines seriques de *Salmo salar*: Etude electrophoretique / A. Drilhon, I.M. Fine // *Comptes Rendus des Sciences de la Societe de Biologie*. – 1963. – Vol. 157, iss. 11. – P. 1897-1900.
198. Eckwert H. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure I. Principles and toxicological assessment / H. Eckwert, G. Alberti, H. R. Kohler // *Ecotoxicology*. – 1997. – Vol. 6. – P. 249–262.
199. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus* / H. Liu, W. Wang, J. Zhang [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2006. – Vol. 65, iss. 3. – P. 350–354.
200. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles / R. Rueda-Jasso, L.E.C. Conceição, J. Dias [et al.] // *Aquaculture*. – 2004. – Vol. 231. – P. 417–433.
201. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defense mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.) / D.R. Tocher, G. Mourente, A. Van der Ecken [et al.] // *Aquaculture Nutrition*. – 2002. – Vol. 8, iss. 3. – P. 195–207.
202. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch / S. Pandey, S. Parvez, R. A. Ansari [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008. – Vol. 174, iss. 3. – P. 183–192.
203. Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed aeromonas hydrophila on lymphocytes and serum proteins of common carp, *Cyprinus carpio* / R.

Peyghan, G.H. Khadjeh, N. Mozarmnia [et al.] // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 1. – P. 26–29.

204. Effect of long term exposure of low level diesel oil on the antioxidant defense system of fish / J.F. Zang, H. Shen, T L. Xu, [et al.] // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2003. – Vol. 71, iss. 2. – P. 234–239.

205. Effects of 4-nonylphenol on metabolic enzymes, some ions and biochemical blood parameters of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) / A. Sayed, H. El-Din, I. A. A. Mekawy [et al.] // *African Journal of Biochemistry*. – 2011. – Vol. 5, iss. 9. – P. 287–297.

206. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) / J. Sturve, L. Hasselberg, H. Fälvh [et al.] // *Aquatic Toxicology*. – 2006. – Vol. 78. – P. 73–78.

207. Effects of petroleum on the sero-proteins of *Tilapia mossambica*. / H. Shen, Q. Zhang, X. Ren [et al.] // *Marine Environmental Science*. – 1997. – Vol. 16, iss. 1. – P. 1–5.

208. Effects of progesterone and estradiol benzoate on glutathione dependent antioxidant enzyme activities in the brain of female rats / S. B. Pajovic, Z. B. Salcic, V. M. Petrovic [et al.] // *General Physiology and Biophysics*. – 1999. – Vol. 18. – P. 35–44.

209. Effect of sex hormone on lipid peroxidation in liver / K. Huh, U. S. Shin, J. W. Choi [et al.] // *Archives of Pharmacal Research*. – 1994. – Vol. 17, iss. 2. – P. 109–114.

210. Effects of tributyltin, benzo[a]pyrene, and their mixture on antioxidant defense system in *Sebastiscus marmoratus* / C. Wang, Y. Zhao, R. Zheng [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2006. – Vol. 65, iss. 3. – P. 381–387.

211. Ethoxyresorufin-Odeethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure / J.J. Whyte, R.E. Jung, C.J. Schmitt, D.E. Tillitt // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2000. – Vol. 30, iss. 4. – P. 347–570.

212. Evaluation of the gill filament-based EROD assay in African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) as a monitoring tool for waterborne PAH-type contaminants / R.

- H. Mdegela, J. Myburgh, D. Correia [et al.] // *Ecotoxicology*. – 2006 a. – Vol. 15, iss. 8. – P. 51–59.
213. Evaluation of the use of protein electrophoresis of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burehell, 1822) for biomonitoring aquatic pollution / A.G.M. Osman, R.M. Al-Awadhi, A.S.A. Harabawy [et al.] // *Environmental Research Journal*. – 2010. – Vol. 4, iss. 3. – P. 235–243.
214. Evenson M.A. Influenes of fatty acids on the isoelectric point properties of human serum albumin / M.A. Evenson, H.F. Deutsch // *Clinica Chimica Acta*. – 1978. – Vol. 89, iss. 2. – P. 341–354.
215. Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patterns of organochlorine contaminants in members of a marine food web / A. Ruus, M. Sandvik, K. I. Ugland [et al.] // *Aquatic Toxicology*. – 2002. – Vol. 61, iss. 1–2. – P. 73–87.
216. Falfushynska H. I. Function of Metallothioneins in Carp *Cyprinus carpio* from Two Field Sites in Western Ukraine / H. I. Falfushynska, O.B. Stoliar // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2009. – Vol. 72. – P. 1425–1432.
217. Filho D. W. Antioxidant defences in marine fish – II. Elasmobranchs / D. W. Filho, A. Boveris // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C*. – 1993. – Vol. 106, iss. 2. – P. 415–418.
218. Filho D.W. Antioxidant defences in marine fish – I. Teleosts / D.W. Filho, C. Giulivi, A. Boveris // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C*. – 1993. – Vol. 106, iss. 2. – P. 409–413.
219. Fitzgerald J.P. Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleosts fish / J.P. Fitzgerald // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B*. – 1992. – Vol. 101. – P. 111–114.
220. Friguet B. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxynonenal cross-linked protein / B. Friguet, L. I. Szveda // *FEBS Letters*. – 1997. – Vol. 405, iss. 1. – P. 21–25.
221. Friguet B. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxynonenal. Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic

- protease / B. Friguet, E.R. Stadtman, L.I. Sweda // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269, no. 34. – P. 21639–21643.
222. Gad N.S. Oxidative stress and antioxidant enzymes in *Oreochromis niloticus* as biomarkers of exposure to crude oil pollution / N.S. Gad // International Journal of Environmental Science and Engineering. – 2011. – Vol 1. – P. 49–58.
223. Gallagher E.P. Decreased glutathione-S-transferase expression and activity and altered sex steroids in Lake Apopka brown bull heads (*Ameiurus nebulosus*) / E.P. Gallagher, T.S. Gross, K.M. Sheehy // Aquatic Toxicology. – 2001. – Vol. 55, iss. 3–4. – P. 223–237.
224. Galloway T. Biomarkers in environmental and human health risk assessment / T. Galloway // Marine Pollution Bulletin. – 2006. – Vol. 53. – P. 606–613.
225. Gorbi S. Seasonal Variability of Metallothioneins, Cytochrome P450, Bile Metabolites and Oxyradical Metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and Striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae) / S. Gorbi, C. Baldini, F. Regoli // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 2005. – Vol. 49. – P. 62–70.
226. Grune T. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells / T. Grune, T. Reinheckel, K.J.A. Davies // FASEB Journal. – 1997. – Vol. 11, no. 7. – P. 526–534.
227. Halliwell B. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // Archive Biochemistry and Biophysics. – 1986. – Vol. 246, no. 2. – P. 501–514.
228. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / D. Harman // Journal of Gerontology. – 1956. – Vol. 2. – P. 298–300.
229. Harris R.I. The pre-albumin fraction: a useful parameter in the interpretation of routine protein electrophoresis / R.I. Harris, J. Kohn // Journal of Clinic Pathology. – 1974. – Vol. 27, no. 12. – P. 986–989.
230. Hassan H.M. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutase / H.M. Hassan // Free Radical Biology & Medicine. – 1988. – Vol. 5, iss. 4. – P. 377–385.
231. Hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in two species of benthic fish showing different prevalences of contaminant-associated liver neoplasms / T.K. Collier, S.V.

- Singh, Y.C. Awasthi, U. Vavanasi // Toxicology and Applied Pharmacology. – 1992. – Vol. 113, iss. 2. – P. 319–324.
232. Hermes-Lima M. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress / M. Hermes-Lima, T. Zenteno-Savin // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 2002. – Vol. 133. – P. 537–556.
233. Herschberger W.K. Some physicochemical properties of transferrins in brook trout / W. K. Herschberger // Transactions of the American Fisheries Society. – 1970. – Vol. 99, no. 1. – P. 207–218.
234. Hutchinson T.H. Evaluation of immune function in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (L.) exposed to sediments contamination with polychlorinated biphenils. / T.H. Hutchinson, M.D. Field, M.J. Manning // Fish Shellfish Immunology Journal. – 1999. – Vol. 9, no. 6. – P. 457–472.
235. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues / V.I. Lushchak, T. V. Bagnyukova, O.V. Lushchak [et al.] // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 2005. – Vol. 37. – P. 1319–1330.
236. Identification, characterization and crystal structure of the Omega class glutathione transferases / P.G. Board, M. Coggan, G. Chelvanayagam [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, no. 32. – P. 24798–24806.
237. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD) / X. Zhang, F. Yang, X. Zhang [et al.] // Aquatic Toxicology. – 2008. – Vol. 86, iss. 1. – P. 4–11.
238. Influence of 17 α – ethynylestradiol on CYP1A, GST and biliary FACs responses in male African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to waterborne Benzo[a]Pyrene / R. H. Mdegela, M. Braathen, D. Correia [et al.] // Ecotoxicology. – 2006. – Vol. 15, iss. 8. – P. 629–637.
239. Jyothi B. Pesticide induced alterations of non-protein nitrogenous constituents in the serum of a freshwater Catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) / B. Jyothi, G. Narayan // Indian Journal of Experimental Biology. 2000. – Vol. 38, no. 10. – P. 1058–1061.

240. Kamal S.M. Effect of different stocking densities on hematological and biochemical parameters of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* fingerlings / S.M. Kamal, W.A. Omar // Life Science Journal. – 2011. – Vol. 8, no. 4. – P. 580–586.
241. Katagi T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides of aquatic organisms / T. Katagi // Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. – 2010. – Vol. 204. – P. 1–132.
242. Ketterer B. Glutathione transferases: a possible role in the detoxication and repair of DNA and lipid hydroperoxides / B. Ketterer, D.J. Meyer // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1989. – Vol. 214, iss. 1. – P. 33–40.
243. Kishi S. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence / S. Kishi, J. Uchiyama, A.M. Baughman // Experimental Gerontology. – 2003. – Vol. 38, iss. 7. – P. 777–786.
244. Koehn K. Serum haptoglobins in some North American Catostomid fishes / K. Koehn // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1966. – Vol. 17, iss. 1. – P. 349–352.
245. Kopecka J. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper / J. Kopecka, J. Pempkowiak // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2008. – Vol. 70, iss. 3. – P. 379–391.
246. Krauel K.K. Immuno-electrophoretic studies of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) serum / K.K. Krauel, G.J. Ridgway // International Archives of Allergy and Immunology. – 1963. – Vol. 23, no. 5. – P. 243–256.
247. Kuenzle C.C. Affinity labeling of the primary bilirubin binding site of human serum albumin / C.C. Kuenzle, N. Gitzelmann-Cumarsamy, K.J. Wilson // Journal of Biological Chemistry. – 1976. – Vol. 251, no. 3. – P. 801–807.
248. Levine R.L. Oxidative modification of proteins during aging / R.L. Levine, E.R. Stadtman // Experimental Gerontology. – 2001. – Vol. 36. – P. 1498–1502.
249. Lushchak V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals / V.I. Lushchak // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 2011. – Vol. 153, iss. 2. – P. 175–190.

250. Manwell C. Study of detergent pollution by molecular methods: starch gel electrophoresis of a variety of enzymes and other proteins / C. Manwell, C.M.A. Baker // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. – 1967. – Vol. 47, iss. 3. – P. 659–675.
251. Marco P.D. Assessment of blood chemistry reference values for cultured sturgeon hybrids (*Acipenser naecarii* femaleX *Acipenser baerii* male) / P.D. Marco, A. Priori, M.G. Finoia // Journal of Applied Ichthyology. – 2011. – Vol. 27. – P. 584–590.
252. Maret W. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters / W. Maret, B.L. Vallee // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95, no. 7. – P. 3478–3482.
253. Martinez-Alvarez R.M. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors / R.M. Martinez-Alvarez, A.E. Morales, A. Sanz // Reviews in Fish Biology and Fisheries. – 2005. – Vol. 15. – P. 75–88.
254. Metcalf V.J. Fatty acid transport in cartilaginous fish: absence of albumin and possible utilization of lipoproteins / V.J. Metcalf, N.J. Gemmell // Fish Physiology and Biochemistry. – 2005. – Vol. 31. – P. 55–64.
255. Modulation of biochemical and hematological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to toxic cyanobacterial water bloom / R. Kopp, M. Palikova, S. Navratil [et al.] // Acta Veterinaria Brno. – 2010. – Vol. 79. – P. 135–146.
256. Moriwaki H. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction / H. Moriwaki, M.R. Osborn, D.H. Phillips // Toxicology in Vitro. – 2008. – Vol. 22. – P. 36–44.
257. Nagai T. Glutathione peroxidase from the liver of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* / T. Nagai, T. Yukimoto, N. Suzuki // Zeitschrift für Naturforschung. – 2002. – Vol. 57, no. 1-2. – P. 172–176.
258. Nakano T. Partial purification and properties of glutathione peroxidase from carp hepatopancreas / T. Nakano, M. Sato, M. Takeuchi // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B. – 1992. – Vol. 102. – P. 31–35.

259. Napierska D. Biomarkers of contaminant exposure: result of a field study with flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea / D. Napierska, M. Podolska // *Marine Pollution Bulletin*. – 2005. – Vol. 50, iss. 3. – P. 758–767.
260. Nishikimi M. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine / M. Nishikimi, N.A. Rao, K. Jagik // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1972. – Vol. 46, iss. 2. – P. 849–854.
261. Otto D. M. E. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age / D. M. E. Otto, T. W. Moon // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 1996. – Vol. 15. – P. 349–358.
262. Oxidative modifications impair albumin quantification / R. Michelis, B. Kristal, T. Snitkovsky [et al.] // *Biochemical and Biophysical. Research Communications*. – 2010. – Vol. 401, iss. 1. – P. 137–142.
263. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation / V.I. Lushchak, L.P. Lushchak, A.A. Mota [et al.] // *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2001. – Vol. 280. – P. 100–107.
264. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / M.C. Hidalgo, A. Expósito, J.M. Palma [et al.] // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2002. – Vol. 34, iss. 2. – P. 183–193.
265. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone / I. Ahmad, V.L. Maria, M. Oliveira [et al.] // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2006. – Vol. 608, iss. 1. – P. 16–18.
266. Padros J. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study / J. Padros, E. Pelletier, C.O. Ribeiro // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2003. – Vol. 192, iss. 1. – P. 45–55.
267. Parvez S. Protein Carbonyls: Novel Biomarkers of Exposure to Oxidative Stress-Inducing Pesticides in Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) / S. Parvez, S.

Raisuddin // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2005 – Vol. 20, iss. 1. – P. 112–117.

268. Peres G. Effect d'une diminution experementalle de la salinite aquatique sur les activities superoxyde dismutase, catalase et peroxidase de l'hematie d'un possion euryhalin, le Loup (*Dicentrarhus labrax* L.) / G. Peres, H. Roche // Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales. – 1989. – Vol. 183, iss. 3. – P. 247–255.

269. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen / S. W. Ross, D. A. Dalton, S. Kramer [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 2001. – Vol. 130. – P. 289–303.

270. Polymorphism of transferrins in carp (*Cyprinus carpio* L.) – genetic determination, isolation and partial characterization / M. Valenta A., Stratil, V. Slechtova [et al.] // Biochemical Genetics. – 1976. – Vol. 14, iss. 1-2. – P. 27–45.

271. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muskl in vivo and in vitro. Proceedings of the Society for Experimental / A. M. Persky, P. S. Green, L. Stabley [et al.] // Biology and Medicine. – 2000. – Vol. 223. – P. 59–66.

272. Protein carbonil groups as biomarkers of oxidative stress / I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 2003. – Vol. 329. – P. 23–38.

273. Powell S.R. The antioxidant properties of zinc / S.R. Powell // Journal of Nutrition. – 2000. – Vol. 130, no. 5. – P. 1447–1454.

274. Rabestein D.L. Evans Glutathione and its metal-complexes // Metal ions in biological systems. / D.L. Rabestein, R. Guevremont C.A. Evans. – New York, 1985. – P. 104–141.

275. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides complex*) to inorganic pollutants exposure / P.A. Lopes, T. Pinheiro, M.C. Santos [et al.] // Science of the Total Environment. – 2001. – Vol. 280, iss. 1–3. – P. 153–163.

276. Responses of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Antioxidant Defenses in Gills of the Freshwater Catfish (*Heteropneustes fossilis*) to

- Short-term Elevated Temperature / M.S. Parihar, T. Javeri, T. Hemnani [et al.] // Journal of Thermal Biology. – 1997. – Vol. 22. – P. 151–156.
277. Roche H. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme in vitro of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax* / H. Roche, G. Boget // Toxicology in Vitro. – 1993. – Vol. 7, iss. 5. – P. 623–629.
278. Ronisz D. Seasonal variations in the activity of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpot (*Zoarces viviparous*) / D. Ronisz, D. G. J. Larsson, L. Forlin // Marine Environmental Research. – 2000. – Vol. 50. – P. 438–439.
279. Rudneva I. Impact of metallurgical industry on the coastal ecosystem of Black Sea countries // Approaches to Handling Environmental Problems in the Mining and Metallurgical regions / Eds. L. Filho, I. Butorina. – Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 2003. – P. 27–33.
280. Rudneva I.I. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts / I.I. Rudneva // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 1997. – 118. – P. 255–260.
281. Rudneva I.I. Glutathione-S-transferase activity in tissues of Black Sea fish species / I.I. Rudneva, N.S. Kuzminova, E.N. Skuratovskaya // Asian Journal of Experimental Biological Science. – 2010. – Vol. 1, iss. 1. – P. 141–150.
282. Rudneva I.I. Metabolic rate of marine fish in early life and its relationship to their ecological status / I.I. Rudneva., V.G. Shaida // Fish Ecology / Ed. Gempsy P. – New York : Nova Science Publishers, 2012. – P. 1–29.
283. Sarasquerte C. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies / C. Sarasquerte, H. Segner // Science of the Total Environment. – 2000. – Vol. 247, iss. 2–3. – P. 313–332.
284. Seasonal and Organ Variations in Antioxidant Capacity, Detoxifying Competence and Oxidative Damage in Freshwater and Estuarine Fishes from Southern Brazil / A.M. Da Rocha, D.P. Salomo de Freitas, M. Burns [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 2009. – Vol. 150. – P. 512–520.

285. Sen A. Effects of metals and detergents on biotransformation and detoxification enzymes of leaping mullet (*Liza saliens*) / A. Sen, A. Semiz // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2007. – Vol. 68, iss. 3. – P. 405–411.
286. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.) / K. Winzer, G. W. Winston, W. Becher [et al.] // *Aquatic Toxicology*. – 2001. – Vol. 52. – P. 143–155.
287. Shiau S.Y. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*, *O. aureus*) / S.Y. Shiau, C.Y. Hsu // *Aquaculture*. – 2002. – Vol. 210. – P. 335–342.
288. Simonata J. Biochemical, physiological and histological changes in neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposure to diesel oil / J. Simonata, C. Guedes, C. Martinez // *Ecotoxicology and Environmental. Safety*. – 2008. – Vol. 69. – P. 112–120.
289. Smith J. Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase / J. Smith, A. Shrift // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B*. – 1979. – Vol. 63. - P. 39–44.
290. Soltys B.J. Steroid modification of human serum albumin binding properties / B.J. Soltys, J.C. Hsia // *Journal of Biological Chemistry*. – 1978. – Vol. 253, no. 12. – P. 4266–4269.
291. Stadtman E.R. Protein oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine // *Annals of New York Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 899. – P. 191–208.
292. Stadtman E.R. Free-radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E.R. Stadtman, R.L. Levine // *Amino Acids*. – 2003. – Vol. 25. – P. 207–218.
293. Stadtman E.R. Inactivation of *Escherichia coli* glutamine synthetase by xanthine oxidase, nicotinate hydroxylase, horseradish peroxidase, or glucose oxidase: effects of ferredoxin, putidaredoxin, and menadione / E.R. Stadtman, M.E. Wittenberger // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1985. – Vol. 239. – P. 379–385.
294. Stadtman E.R. Protein oxidation by the cytochrome P-450 mixed function oxidation system / E.R. Stadtman, M. Arai, B.S. Berlett // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol. 338, iss. 1. – P. 432–436.

295. State of black scorpionfish (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1785) inhabited coastal area of Sevastopol region (Black sea) in 1998–2088 / N. Kuzminova, I. Rudneva, L. Salekhova [et al.] // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2011. – Vol. 11. – P. 101–111.
296. The effect of MS 222 an anaesthetic on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater and marine fish species / T. Gabrielak, G. Zalesna, H. Roshe, G. Peres // Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C. – 1989. – Vol. 92, no. 1. – P. 5–8.
297. Tkachenko V. Prooxidant-antioxidant balance in rats liver microsomes under radiation and alimentar factors influence / V. Tkachenko, Y. Nikitchenko, V. Tovstiak // Annales Universitatis Mariae Curie Skodowska Sectio DDD, Pharmacia. – 2004. – Vol. 17, no. 2. – P. 289–291.
298. Toxic effects of cobalt parahydroxybenzoate on tissue histopathology and serum proteins in *Capoeta capoeta capoeta* / M. Yilmaz, Y. Ersan, M. Karaman [et al.] // Fresenius Environmental Bulletin. – 2008. – Vol. 17, no. 9. – P. 1322–1327.
299. Toxic effect of cadmium on the electrophoretic protein patterns of gill and muscle of *Oreochromis mossambicus* / K. Muthukmaravel, P. Kumarsamy, A. Amsath [et al.] // E-Journal of Chemistry. – 2007. – Vol. 4, iss. 2. – P. 284–286.
300. Toxicity bioassay and changes in haematological parameters of *Oreochromis niloticus* by trichlorfon / H.F. Al Kahem, Z. Ahmed, A.S. Al-Akell [et al.] // Arab Gulf Journal of Scientific Research. – 1998. – Vol. 16, no. 3. – P. 581–593.
301. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch) / C.D. Nwani, W.S. Lakra, N.S. Nagpure [et al.] // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2010. – Vol. 7. – P. 3298–3312.
302. Van der Oost R. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review / R. Van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2003. – Vol. 13, iss. 2. – P. 57–149.
303. Wendel A. Enzymes: Toolsance Targets / A. Wendel. – Basel : Karger, 1988. - 161 p.

304. Williams K.J. Oxidation lipoproteins and atherosclerosis / K.J. Williams, E.A. Fisher // *Current Opinion in Clinic Nutrition & Metabolic Care*. – 2005. – Vol. 8. – P. 139–146.
305. Winston G.W. Pro-oxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms / G.W. Winston, R.T. Di Giulio // *Aquatic Toxicology*. – 1991. – Vol. 19. – P. 137–161.
306. Woo N.Y.S Metabolic and osmoregulatory responses of the sea bass *Llates calcarifer* to nitrite exposure / N.Y.S. Woo, S.F. Chiu // *Environmental Toxicology and Water Quality*. – 1997. – Vol. 12, iss. 3. – P. 257–264.
307. Xenobiotic metabolism markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables / M. Sole, S. Rodriguez, V. Papiol [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. C*. – 2009. – Vol. 149. – P. 83–89.
308. Yekeen T.A. Toxic effects of endosulfan on haematological and biochemical indices of *Clarias gariepinus* / T.A. Yekeen, O.O. Fawole // *African Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 10, no. 64. – P. 14090–14096.
309. Zacharia S. Changes in serum proteins and immune response in *Oreochromis mossabicus* induced by aflatoxin B₁ / S. Zacharia, P.C. Thomas, M.P. Paulton // *Indian Journal of Fisheries*. – 2003. – Vol. 50, no. 4. –P. 421–426.
310. Zeenath U.A. Brain lipid peroxidation and antioxidant status after acute methacrylonitrile intoxication / U.A. Zeenath, D.S. Niranjali // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2005. – Vol. 28. – P. 187–195.